



Mapa
Genoma Brasil

Coleta e Registro de Dados em Medicina Genômica

Subprojeto II - Cardiogenética

Livro 5



A Beneficência
Portuguesa
de São Paulo



PROADI-SUS
Programa de Apoio ao Desenvolvimento
Institucional do Sistema Único de Saúde



MINISTÉRIO DA
SAÚDE



Projeto Mapa Genoma Brasil

BP - A Beneficência Portuguesa de São Paulo

Gerente Executivo PROADI SUS:

Dante Dianezi Gambardella

Coordenadora Projeto Mapa Genoma Brasil

Mariana Beraldo da Costa Saad

Coordenador Projeto Qualificação e Treinamento

José Pereira de Souza

Assessoria Técnica

Erika Maria Monteiro Santos

Autoras

Emanuelle Leonilia Marques

Mariana Lombardi Peres de Carvalho

Equipe Qualificação e Treinamento

Cristiane da Fonseca Amancio

Fernando Alves Alencar de Moura

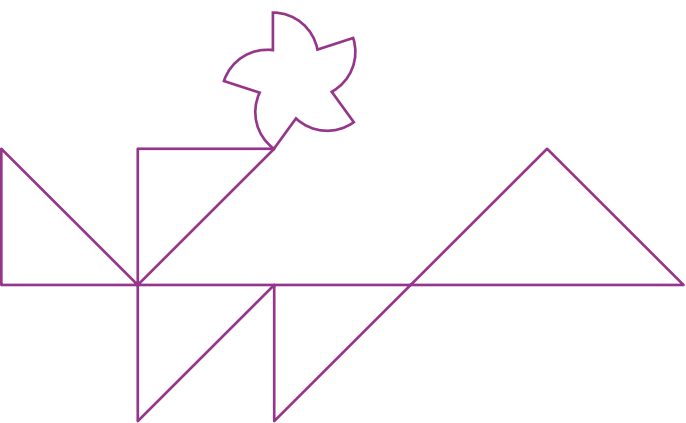
Giovanna Tiemi Goto Forniells

Luanda Guimarães da Silva

Lucas Campacci

Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.





Apresentação

Prezado(a) Colega,

Nesta apostila, abordaremos como os testes genéticos são realizados, com o objetivo de determinar, a partir de uma análise minuciosa do nosso DNA, se temos maiores riscos e propensões a desenvolver determinadas doenças, como é o caso do câncer.

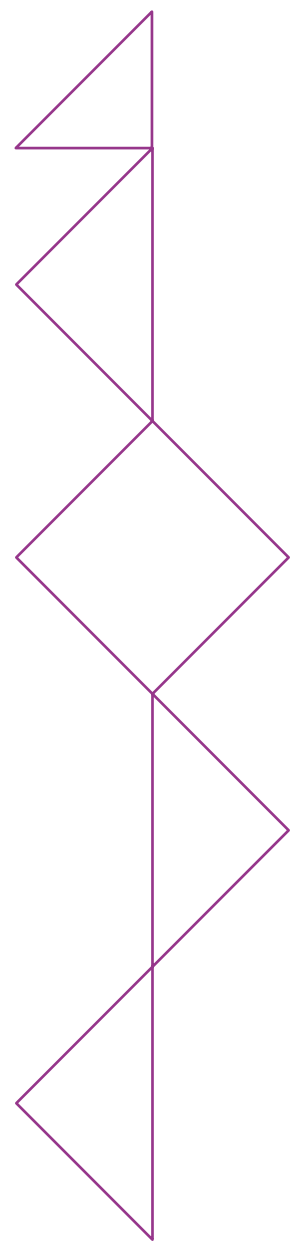
Além disso, questões importantes envolvendo o termo de consentimento para realização de testes genéticos, o avanço da tecnologia em relação ao sequenciamento do DNA e o impacto do resultado do teste não apenas para o portador de uma variante patogênica em um gene, mas também para a família e como lidar com a complexidade de situações bem como o impacto emocional de um teste positivo.

Agradecemos pela oportunidade de compartilhar esses conceitos com todos vocês.

Desejamos ótimos estudos!

Atenciosamente,

Equipe Mapa Genoma Brasil



Su má rio



Dicas

- O índice é interativo, permitindo que você seja direcionado para o tópico desejado com um clique.
- Além disso, ao clicar no logo do Mapa Genoma Brasil no topo, você retornará ao índice.

1 Princípios do Teste Genético 05

Cardiogenética 07

Definição do teste genético 08

Papel do teste genético em oncologia 09

Teste genético para risco de câncer 10

Evolução do teste genético: do teste de genes únicos até a avaliação do genoma 13

2 Técnicas utilizadas no Projeto Mapa Genoma Brasil 16

Sequenciamento Sanger 17

NGS (Next Generation Sequencing) ou Sequenciamento de próxima geração 19

WES (Whole Exoma Sequencing) ou Sequenciamento complexo do exoma 22

WGS (Whole Genome Sequencing) ou Sequenciamento completo do genoma 24

Amplificação multiplex de Sonda Dependente de Ligação (MLPA) 27

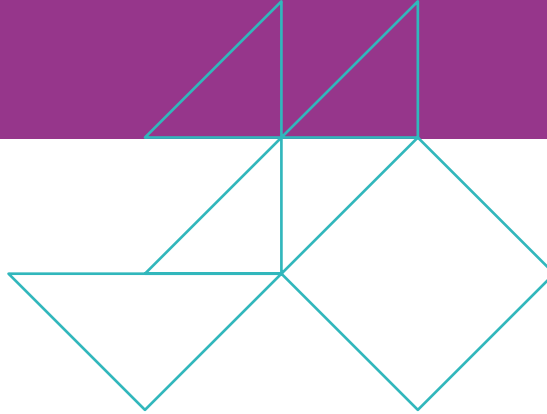
3 Implicações do teste genético 29

Consentimento para realização do teste genético 29

Achados secundários ou incidentais 35

Referências 31

1. Princípios do Teste Genético



Introdução

Nas últimas décadas, a comunidade científica alcançou um enorme progresso no campo na genética e genômica humana e no entendimento de sua variabilidade natural. Os estudos de “decodificação” do genoma humano, em seu sentido mais amplo, levaram ao entendimento de mecanismos moleculares e patogênese de muitas doenças e que hoje são alicerces para pesquisas e desenvolvimento de novas tecnologias e tratamento de doenças (Inoue and Lupski, 2002).

Sabemos que todos somos iguais, porém diferentes. Apesar de sermos da mesma espécie, nosso DNA, dentro daqueles bilhões de bases nitrogenadas, alinhadas formando as moléculas de DNA, possui variantes que nos fazem únicos do ponto de vista molecular. Essas alterações genéticas podem ser mais frequentes ou mais raras em termo populacionais, ou mais frequentes em uma determinada população. As mesmas encontram-se espalhadas por todo nosso genoma e podem estar em regiões codificantes de proteínas, regiões regulatórias, regiões intrônicas ou intergênicas.

O tipo mais comum de variante no genoma humano consiste na variação de uma única base - os chamados polimorfismos de base única (SNP – Single Nucleotide Polymorphism). Estima-se que uma pessoa

tenha de 4 a 5 milhões de SNP (Shen et al., 2013). Temos também outros tipos de variações em nosso genoma como inserções e deleções, regiões de pequenas ou grandes repetições in tandem como as regiões de microssatélite, e variantes estruturais que afetam grandes regiões cromossômicas. Muitas dessas variantes estão localizadas em regiões genômicas não funcionais, consideradas “neutras” e não causam impacto fenotípico. Porém, quando essas variantes ocorrem em sequências codificadoras de proteínas ou em regiões regulatórias, elas podem alterar a sequência de proteínas ou o nível de expressão e tradução de um determinado gene, causando sérios efeitos fenotípicos (Inoue and Lupski, 2002).

O espectro de variantes genéticas que predis põem a doenças abrange desde variantes raras e altamente deletérias que são responsáveis por doenças hereditárias mendelianas à polimorfismos comuns que sozinhos não causam por si só efeito nenhum, mas somados com outros polimorfismos, podem influenciar um determinado fenótipo e que “combinados” podem constituir um risco para uma determinada doença. Nesse último caso, o termo Doença Complexa é frequentemente utilizado para denotar esse padrão de herança diferente do padrão mendeliano, que ocorre no caso de variantes altamente deletérias em um

único gene (Cambien and Tiret, 2007). Dentro da genética cardiovascular, as doenças hereditárias mendelianas são mais “facilmente” diagnosticadas geneticamente do que doenças complexas por serem associadas a uma variante genética única e não a um conjunto de polimorfismos.

Essas variantes podem ser classificadas de acordo com a sua “consequência” funcional no gene. As variantes mais frequentes são do tipo pontuais, onde ocorre a substituição de um único nucleotídeo e podem ter 3 tipos de consequências - substituição de um aminoácido por outro (não sinônima), sinônima (apesar da substituição do nucleotídeo, não há alteração do aminoácido nas proteínas) e alterações do tipo nonsense onde a alteração de base sinaliza um término prematuro na tradução da proteína, fazendo com que ela seja mais curta impactando seu funcionamento. Há também as variantes do tipo inserções ou deleções quando um ou mais nucleotídeos são adicionados ou perdidos na sequência de DNA. Uma das principais consequências desse tipo de variante é a alteração no quadro de leitura do gene causando uma proteína não funcional (den Dunnen et al., 2016).

Os avanços nos estudos de genes causadores de diversas patologias (não apenas cardiovasculares) levaram a necessidade da curadoria de dados de forma organizada e de fácil acesso à comunidade científica, além de padronização da interpretação de variantes genéticas e sua frequência na população mundial. Surgiram dessa necessidade diversos repositórios públicos que reportam relações entre variantes genéticas e

fenótipos; repositórios de dados genéticos de sequenciamento de exomas e genomas de diversas populações com dado de frequência alélica - que são extremamente importantes para a classificação de variantes genéticas; e de algoritmos de predição de patogenicidade de variantes in silico que se baseiam no efeito da variante genética para a proteína e conservação da variante entre diferentes espécies.

Em 2015, o American College of Medical Genetics and Genomics e a Association for Molecular Pathology conjuntamente publicaram uma diretriz com o objetivo de padronizar a classificação das variantes genéticas, que antes eram classificadas de forma desorganizada e de forma independente pelos grupos de pesquisa. Nesse artigo, introduziram uma terminologia padronizada na classificação de variantes que causam doenças mendelianas - “patogênicas”, “possivelmente patogênicas”, “significado incerto”, “possivelmente benigna” e “benigna”. Essa classificação baseia-se em dados populacionais de frequência, dados funcionais, computacionais e de segregação e são a base para a classificação de variantes até hoje (Richards et al., 2015).

A importância da classificação dessas variantes através de uma abordagem translacional entre pesquisa básica e clínica é extremamente importante. A necessidade de cooperação entre médicos, geneticistas e biólogos moleculares somado a expertise em análise de imagens e patologistas só demonstra quão necessária é uma abordagem multidisciplinar para que ocorra um diagnóstico correto dessas doenças, classificação das alterações genéticas e

melhor entendimento dos mecanismos moleculares das doenças genéticas. Dessa forma, estratégias farmacológicas mais eficientes e testes de novas substâncias e terapias se tornam possíveis.

Cardiogenética

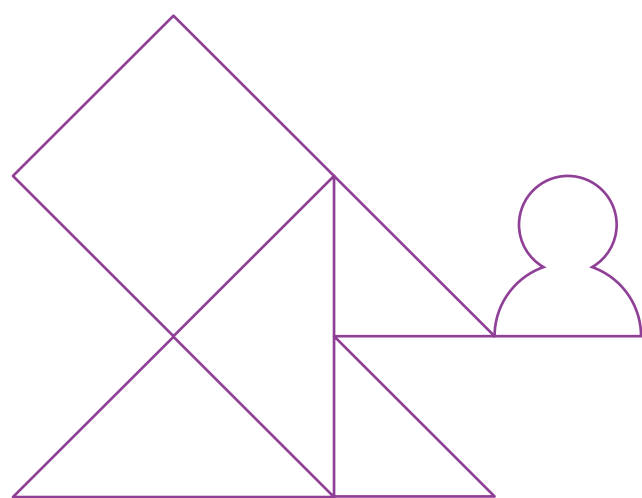
A genética cardiovascular, ou cardiogenética, é uma subespecialidade emergente e em rápida evolução dentro da medicina cardiovascular. Seu avanço se deu, principalmente, com as novas tecnologias do sequenciamento e interpretação do genoma humano, com o melhor entendimento de mecanismos moleculares de várias doenças cardíacas incluindo cardiomiopatias, arritmias, insuficiência cardíaca, distúrbios lipídicos, doenças cardíacas derivadas de condições neuromusculares, doenças vasculares incluindo as aortopatias, além da incorporação do uso de testes genéticos na prática clínica. (Dainis and Ashley, 2018; Ahmad et al., 2019)

Antigamente, era complexa a realização de um teste genético para diagnóstico, devido ao alto valor. Atualmente, com a facilidade na geração de dados genéticos através dos sequenciamentos que utilizam tecnologias de larga escala e a grande oferta no mercado de laboratórios comerciais que disponibilizam painéis de genes e até mesmo testes do tipo exoma e genoma, o diagnóstico genético se tornou uma ferramenta extremamente importante para o diagnóstico acurado e manejo de pacientes com suspeita de doença cardiovasculares hereditária

(Otto, Savla and Hisama, 2020).

Ao longo dos últimos anos, diversas diretrizes e consensos de prática clínica foram publicados incorporando os testes genéticos para diagnóstico e tratamento clínico personalizado como modelo de medicina de precisão. Nesse contexto atual, se torna-se extremamente importante que cardiologistas clínicos entendam princípios básicos de genética cardiovascular. Saber identificar os pacientes que poderiam se beneficiar do diagnóstico genético e, consequentemente, do impacto na identificação de uma variante genética patogênica é de suma importância para o paciente e sua família. Além disso, a avaliação genética pode auxiliar na tomada de decisão quanto a abordagem terapêutica mais adequada, aconselhamento genético e mudança de estilo de vida. (Adams et al., 2016), (Stiles et al., 2021), (Ackerman et al., 2011).

Para maiores informações sobre doenças cardiovasculares, critérios para realização do teste genético, principais genes e implicações clínicas e terapêuticas buscar nos folders que foram disponibilizados nas aulas iniciais para cada uma das doenças.



Definição de Teste Genético

O teste genético (TG) pode ser definido como o processo de análise do material genético para encontrar alterações (variantes) que podem causar alguma doença ou que podem aumentar o risco de desenvolvimento de doenças ao longo da vida (Holtzman e Watson 1999).

Essa análise visa identificar, de forma mais específica, quais são as alterações na sequência do DNA ou na estrutura cromossômica. Além disso, é possível realizar a análise de RNA como resultado da expressão gênica ou por meio de análise bioquímica para medir a produção específica de proteínas (American Medical Association, 2019). Na prática clínica, o teste genético pode ser utilizado para diagnosticar doenças em recém nascidos, crianças ou adultos, prever riscos para condições específicas ou obter informações que podem ser usadas para personalizar tratamentos. (Burke 2002).

Além disso, também pode ser usado para determinar filiação biológica de uma criança por meio de teste de paternidade de DNA ou ser usado para prever amplamente a ascendência de um indivíduo.

Com a difusão de realizações de teste genético por toda a prática clínica, podemos distinguir os testes genético de acordo com a sua intenção.

Os tipos de testes genéticos são (Iowa Institute of Human Genetics):

- a. Teste genético clínico:** são realizados para ter o perfil genético do indivíduo como informação adicional sem uma finalidade terapêutica ou diagnóstica específica;
- b. Teste genético de diagnóstico:** realizado para encontrar a causa de uma doença ou sintomas que já estão presentes no indivíduo;
- c. Teste genético pré sintomático:** antes do indivíduo expressar algum sintoma, para descobrir se há um risco para o desenvolvimento de certo tipo de doença ou se há alguma variante que poderá ser passada para descendentes futuros que também pode coloca-los em risco.
- d. Teste genético pré-natal:** é um teste durante a gravidez para ver se o bebê terá uma doença.
- e. Teste genético do recém-nascido:** um teste realizado um a dois dias após o nascimento do bebê para ver se o bebê tem certas doenças.
- f. Teste genético farmacogenômico:** para descobrir o melhor remédio e dose para o indivíduo com base em suas variantes de DNA.

O teste genético é uma ferramenta molecular de extrema importância na prática clínica, trazendo informações personalizadas com a intenção de auxiliar profissionais de saúde a estruturar condutas clínicas preventivas e terapêuticas como também, traz a informação aos indivíduos e famílias para que seja possível compreender e estabelecer como será a rotina de saúde a partir desse conhecimento sobre sua própria estrutura genômica.

Papel do Teste Genético em Oncologia

Há uma necessidade crescente de aconselhamento e testes genéticos para indivíduos diagnosticados com câncer, pois o tratamento pode ser afetado pelos resultados. Além disso, a identificação de variantes patogênicas em indivíduos antes de um diagnóstico de câncer permite uma vigilância, detecção precoce e prevenção do câncer (Pritchard et al 2020).

Na prática clínica da oncologia, podemos realizar o teste genético com duas funções principais, sendo a de análise genética do tecido tumoral (somático) ou a de análise genética do material constitutivo do indivíduo (germinativo). Ambos são muito importantes para a estruturar as questões voltadas a terapêuticas e de estratégias de prevenção de câncer em indivíduos e seus familiares (Smith, 2019).

O teste genético somático é um exame que utiliza o material coletado na biópsia do tumor possibilitando a identificação

de alterações específicas em genes de interesse clínico. De acordo com o perfil genômico do tecido tumoral, estratégias personalizadas de tratamento que garantem um melhor prognóstico podem ser aplicadas. Um exemplo são os casos de câncer de pulmão de células, pois, sabe-se que em tecidos desses tipos de tumores dos quais são encontradas variantes (mutação) no gene EGFR sugere-se o uso de terapias específicas (Khoo et al, 2015).

O raciocínio molecular para o uso de terapias e compreensão dos melhores prognósticos têm sido cada vez mais detalhado e valorizado. Estudos têm avançado para compreender o funcionamento do câncer de forma cada vez mais específica, como pode ser observado nas publicações da Rede de Pesquisa do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA), que detalha o perfil molecular de forma abrangente de diversos tipos tumorais. No caso de adenocarcinoma de pulmão foram descritas mutações, estatisticamente significativas, em mais de dezoito genes (TP53, KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, MET, RIT1, STK11, KEAP1, NF1, RB1, CDKN2A, SETD2, ARID1A, MARCA4, RBM10, U2AF1 e MGA). Cada gene está atuando em vias e ações diferentes no mecanismo celular, mostrando o quão específico e diversificado é o universo tumoral (Cancer Genome Atlas, 2014).

Esse é um grande avanço para o conhecimento mais específico dos tipos tumorais, favorecendo o avanço de pesquisa e condutas de tratamento. Com isso, profissionais estão cada vez mais especializados e sentindo a necessidade de aplicar na prática clínica

os conhecimentos de bases moleculares para conduzir suas rotinas clínicas.

Outro avanço é a introdução do teste genético germinativo na prática clínica. O teste genético germinativo, tem intenção diferente do teste somático, uma vez que tem como objetivo detectar variantes (mutações) constitutivas dos indivíduos, aquelas que foram herdadas e podem ser transmitidas para as gerações futuras.

Essas alterações quando identificadas em um indivíduo favorecem um grande potencial de condutas a serem realizadas para as questões voltadas à saúde.

No caso de indivíduos já diagnosticados com tipos específicos de câncer, a realização do teste genético germinativo pode favorecer na escolha de condutas terapêuticas, como são os casos de pacientes com tumores de ovário, pâncreas e próstata que possuem variantes patogênicas germinativas no gene BRCA1 ou BRCA2 podem se beneficiar com fármacos que são inibidores da enzima poli adenosina difosfato ribose polimerase, conhecida como PARP (Li et al, 2020).

Essa prática se deu através do conhecimento da letalidade sintética, pois, o medicamento age inibindo as enzimas da PARP que fazem parte da via onde o BRCA1 e BRCA2 atuam, evitando a multiplicação celular, eliminando, portanto, as células cancerosas (Li et al, 2020).

Além de condutas terapêuticas importantes, a descoberta de uma variante germinativa pode interferir em condutas de prevenção e diminuição de risco não só para o indivíduo como para todos os seus familiares.

Com o reconhecimento de que 10%

de todos os cânceres são hereditários, há uma necessidade crescente de melhorar o acesso ao aconselhamento genético e aos testes genéticos, tanto antes quanto no momento do diagnóstico (Robson, M., et al, 2015).

A presença de uma variante germinativa em genes já conhecidos, como aqueles que aumentam o risco de desenvolvimento de câncer ao longo da vida, confere a existência de uma Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer (SPHC).

Reconhecer a presença de uma SPHC faz com que as estratégias de diminuição de risco sejam oferecidas para os pacientes, e assim, o manejo desse risco poderá ser realizado de forma adequada de acordo com o perfil molecular.

Teste genético para risco de câncer

O teste genético germinativo para avaliação de risco de câncer (preditivo) é o tipo de teste usado para procurar mutações genéticas herdadas que podem colocar uma pessoa em maior risco de desenvolver certos tipos de câncer.

Este tipo de teste pode ser aconselhado (American Cancer Society, 2022):

- a. Para uma pessoa com um forte histórico familiar de certos tipos de câncer: Nesse caso é importante verificar se ela carrega uma variante patogênica que aumenta seu risco para desenvolver a doença. Se ela tem uma mutação herdada, é possível

realizar exames para diagnosticar o câncer precocemente ou até mesmo tomar medidas para diminuir o risco.

- b.** Para uma pessoa já diagnosticada com câncer: Nesse caso a sugestão do teste genético pode ser para indicação tanto de condutas terapêuticas quanto se houver outros fatores que sugiram que o câncer pode ter sido causado por uma variante patogênica germinativa (como se o câncer foi diagnosticado em idade jovem, presença de tumores raros ou um forte histórico familiar).
- c.** Para membros da família de uma pessoa conhecida por ter uma mutação genética herdada que aumente o risco de câncer: Quando há na família uma mutação previamente identificada, o teste genético pode auxiliar no diagnóstico molecular e saber se os indivíduos estão sob risco aumentado e se precisam tomar medidas para tentar diminuir o risco.

Existem alguns pontos importantes que se faz necessário para avaliar o risco de câncer frente a uma variante considerada patogênica (mutação), como por exemplo, conhecer quais são os riscos que essa variante confere ao indivíduo ao longo de sua vida.

Na tabela a seguir temos alguns genes que estão representados em suas respectivas síndromes de predisposição hereditária ao câncer e os tipos tumorais mais frequentes.

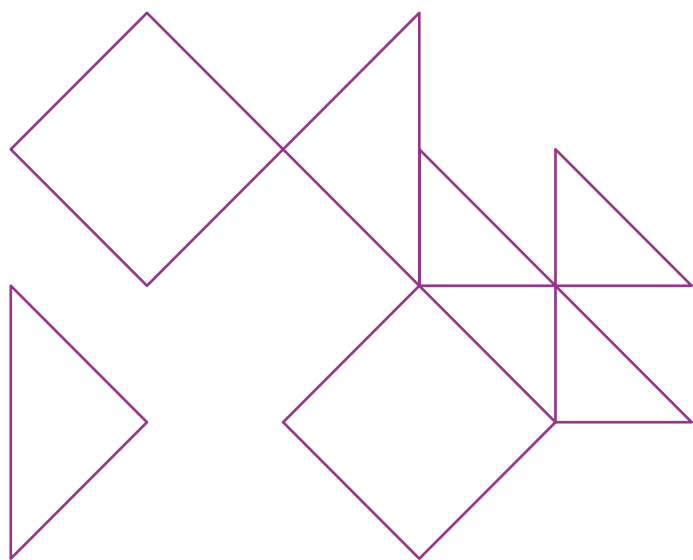


Tabela 1: Genes e as principais síndromes de predisposição hereditária ao câncer com os fenótipos oncológicos mais comum.*

Gene	SPHC**	Tumores comumente associados
APC	Polipose adenomatosa familiar	Cólon, pólipos no intestino, tumores desmóides
BRCA1, BRCA2	Câncer de mama e ovário hereditário	Mama, ovário, pâncreas, próstata, melanoma
CDH1	Síndrome Gástrico Difuso Hereditário	Tumor gástrico difuso, câncer de mama do tipo lobular
MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM	Síndrome de Lynch	Câncer de intestino, reto, endométrio, ovário, trato urinário, pólipos intestinais.
RET	Neoplasia Endócrina Múltipla	Tumor medular de tireoide, feocromocitomas.
RB1	Síndrome Retinoblastoma Hereditário	Retinoblastoma, melanoma, sarcoma
STK11	Síndrome de Peutz-Jeghers	Mama, pólipos hermatomatosos no intestino,
TP53	Síndrome de Li-Fraumeni	Sarcomas, tumor adrenocortical, tumores cerebrais, mama, pulmão.
VHL	Síndrome de Von Hippel-Lindau	Tumor do saco endolinfático, carcinoma de ilhotas pancreáticas, hemangioblastomas em sistema nervoso central, carcinoma de células renais.

*(Tabela adaptada de Schienda & Stopfer, 2020); ** Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer.

A presença de uma variante germinativa em genes já conhecidos, como aqueles que aumentam o risco de desenvolvimento de câncer ao longo da vida, faz com que as estratégias de diminuição de risco sejam oferecidas para os pacientes e assim, o manejo desse risco seja realizado de forma adequada de acordo com o perfil molecular.

Evolução do teste genético: do teste de genes únicos até a avaliação do genoma

A busca do perfil molecular avançou de forma considerável, tanto como na evolução tecnológica quanto no acesso para a prática clínica, uma vez que os custos ficaram mais acessíveis.

Na década de 1970 surgiram duas técnicas que permitiram o sequenciamento de genes específicos: uma das técnicas foi proposta por Maxam e Gilbert e a outra foi proposta por Sanger.

O aprimoramento do método de Sanger resultou nos sequenciadores automatizados. O primeiro sequenciador automatizado utilizou a metodologia de Sanger et al. (1977) que sofreu algumas modificações ao longo da década de 1990 por Edwards e colaboradores (1990).

No ano de 1995 foi sequenciado o genoma da bactéria *Haemophilus influenzae*, o primeiro organismo de vida livre (Fleischmann et al., 1995).

Nos anos seguintes, observamos o sequenciamento de diversas espécies, incluindo da levedura, da mosca-das-frutas, de *Caenorhabditis elegans* e *Arabidopsis thaliana* (Brown, 2003).

Finalmente, no início do século XXI, tivemos o sequenciamento de genomas

de mamíferos, como o humano (Lander et al., 2001), do rato (Waterston et al., 2002) e do chimpanzé (Mikkelsen et al., 2005).

O sequenciamento do genoma humano iniciou em um estudo no ano de 1989 através de um consórcio público com a participação de mais de 5000 cientistas do mundo inteiro, distribuído em centenas de laboratórios, e com a previsão de conclusão para 2005.

A Celera Genomics, empresa fundada por Craig Venter, decidiu sequenciar o genoma humano, mas com um método diferente daquele utilizado pelo consórcio público. A Celera Genomics tinha como objetivo obter as sequências para patentear os genes. Em 2001 foi anunciado um “primeiro rascunho” do genoma humano, e em 2003 foi anunciado o término do projeto, no entanto, o sequenciamento completo foi publicado em 2007.

Desde então, a adoção de testes genéticos disparou. Grande parte dessa tendência é explicada pelo papel crítico que os testes genéticos desempenham na medicina de precisão (uma abordagem de tratamento e prevenção de doenças que busca maximizar a eficácia levando em consideração a variabilidade individual em genes, ambiente, e estilo de vida), bem como pelos avanços nos métodos de sequenciamento de última geração e reduções simultâneas nos custos de sequenciamento.

A Figura 1 apresenta a evolução dos métodos de sequenciamento.

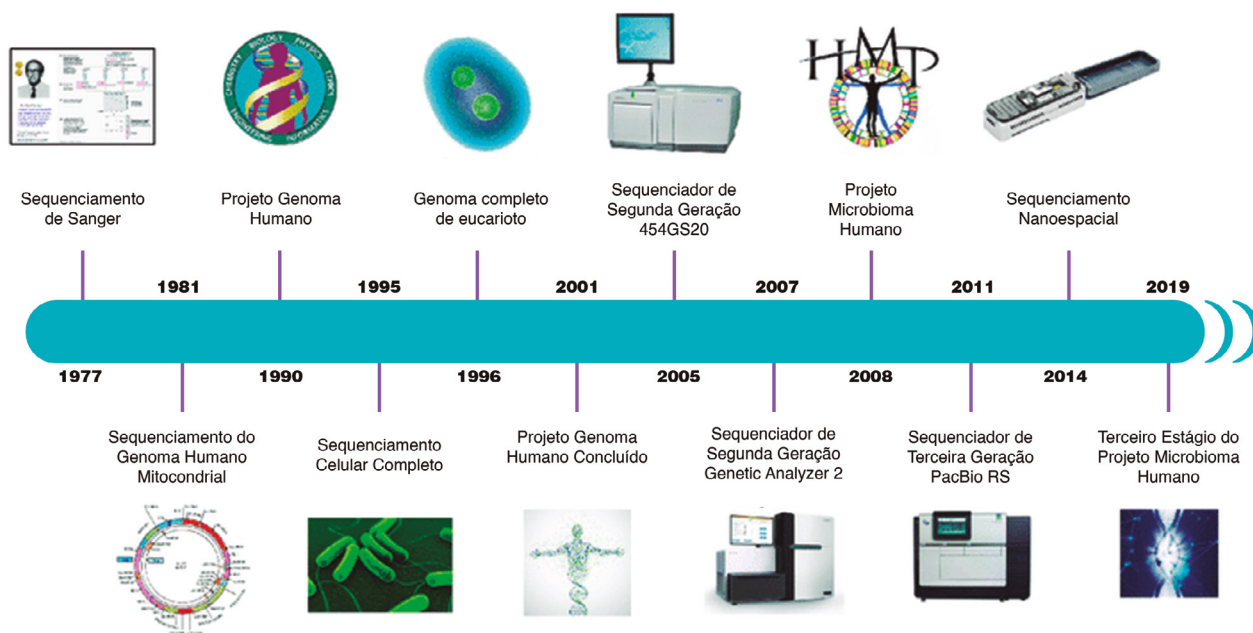


Figura 1 - Evolução dos métodos de sequenciamento. Adaptado de creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0

O modelo tradicional pelo qual um indivíduo era identificado como portador de uma suscetibilidade hereditária ao câncer era testar uma mutação em um único gene ou um número finito de genes associados a uma síndrome específica (por exemplo, BRCA1 e BRCA2 para câncer hereditário de mama e ovário ou genes de reparo mismatch para a Síndrome de Lynch).

A decisão sobre qual gene ou genes testar foi baseada em uma revisão do histórico médico pessoal do paciente e seu histórico familiar.

Com os avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA de última geração, agora é possível oferecer testes simultâneos para vários genes associados a uma suscetibilidade hereditária ao câncer e doenças cardiovasculares. Esses painéis geralmente incluem genes de alta penetrância, mas também costumam incluir genes de penetrância moderada e baixa.

Vários dos genes incluídos nesses painéis não foram totalmente caracterizados em termos de riscos de câncer ou opções de gerenciamento (Lynce, F., Isaacs, C, 2016).

Assim, os testes genéticos evoluíram de

testes de um único gene para testes mais complexos que avaliam vários genes e variam de acordo com o que está sendo analisado (genes únicos, genes múltiplos, exomas ou um genoma inteiro).

Enquanto um teste de gene único é uma análise de um único gene para uma única indicação, um painel genético testa vários genes para uma indicação comum.

O sequenciamento de todo o exoma analisa todas as regiões de codificação do genoma, e o sequenciamento de todo o genoma avalia todo o genoma (regiões codificantes e não codificantes).

O termo análise do genoma completo refere-se ao teste de todo o genoma por um amplo conjunto de métodos, incluindo sequenciamento, microarray e cariótipo e, portanto, inclui o sequenciamento do genoma completo (Phillips, K., et al, 2018). Diferentes tipos de variações genéticas podem afetar a função de um gene e várias tecnologias são usadas para identificar essa diversidade de variantes, dependendo da finalidade do teste.

Cada um tem seus benefícios e limitações e pode afetar as práticas de pedidos.

2. Técnicas utilizadas no Projeto Mapa Genoma Brasil

O projeto Mapa Genoma Brasil irá utilizar duas técnicas de sequenciamento com propósitos distintos: sequenciamento de Sanger e sequenciamento de nova geração (NGS), este último para análise do exoma completo (WES) e do genoma completo (WGS). Além disso será utilizado como técnica complementar para avaliação de variações de número de cópias (CNV) os ensaios amplificação multiplex de sondas dependente de ligação (MLPA).

Vamos discutir essas técnicas a seguir para compreender como elas analisam o material genético e quais as diferenças entre essas formas de análise.

Sequenciamento Sanger

O princípio do método didesoxi (ou de Sanger), baseia-se na habilidade da DNA polimerase de incorporar didesoxinucleotídeo (ddNTP- uma base análoga ao nucleotídeo que não possui o grupo 3'-hidroxil essencial para a formação da ligação fosfodiéster durante a replicação do DNA).

Para a reação de sequenciamento por Sanger é necessário DNA (por exemplo DNA genômico, fragmento de PCR), um primer iniciador, enzima DNA polimerase, nucleotídeos (dNTP), didesoxinucleotídeo marcados fluorescentemente com fluoróforos diferentes para base e um buffer de reação. Durante a reação a DNA polimerase adiciona um desoxinucleotídeo ou o correspondente didesoxinucleotídeo marcado com fluoróforos diferentes em cada etapa da extensão da cadeia. Essa reação é um processo de extensão e ocorre em um único tubo em um termociclador. Quando um desoxinucleotídeo (A, C, G ou T) é adicionado à extremidade 3', a extensão da cadeia pode continuar.

No entanto, quando um didesoxinucleotídeo (ddA, ddC, ddG ou ddT) é adicionado a extremidade 3', a extensão da cadeia termina devido a falta do grupo 3'-hidroxil essencial para a formação da ligação fosfodiéster durante a extensão. O resultado da reação de sequenciamento de didesoxi Sanger é formação de produtos de extensão de vários comprimentos terminados com didesoxinucleotídeos marcados com fluoróforos diferentes dependendo do

ddNTP terminal na extremidade 3'.

Os produtos da reação de sequenciamento são estão separados por tamanho por eletroforese capilar. Durante esse processo, um campo eletromagnético é aplicado para que o DNA carregado negativamente se mova em direção a um eletrodo positivo. A velocidade com que um fragmento de DNA se move através do capilar é inversamente proporcional ao seu peso molecular, o que faz com que os fragmentos menores migrem mais rápido que os maiores. Pouco antes de atingir o eletrodo positivo, os fragmentos de DNA marcados com fluorescência, separados por tamanho, atravessam um feixe de laser. O laser faz com que os ddNTPs dos fragmentos fluoresçam. Um dispositivo de detecção óptica do equipamento detecta essa fluorescência e converte o sinal de fluorescência em dados digitais. Como cada fluoróforo dos quatro ddNTP emite luz em um comprimento de onda diferente quando excitado pelo laser, todas as quatro bases podem ser detectadas e distinguidas em uma injeção capilar. A sequência com que os ddNTPs (o que reflete no tamanho dos fragmentos gerados na reação de extensão) passam pelo laser que irá determinar a sequência do DNA de interesse. Este processo de eletroforese pode separar os produtos da extensão (reação de sequenciamento) por tamanho em uma resolução de uma base. Um software então converte os dados em fluorescência em um cromatograma, onde cada base é identificada por uma cor.

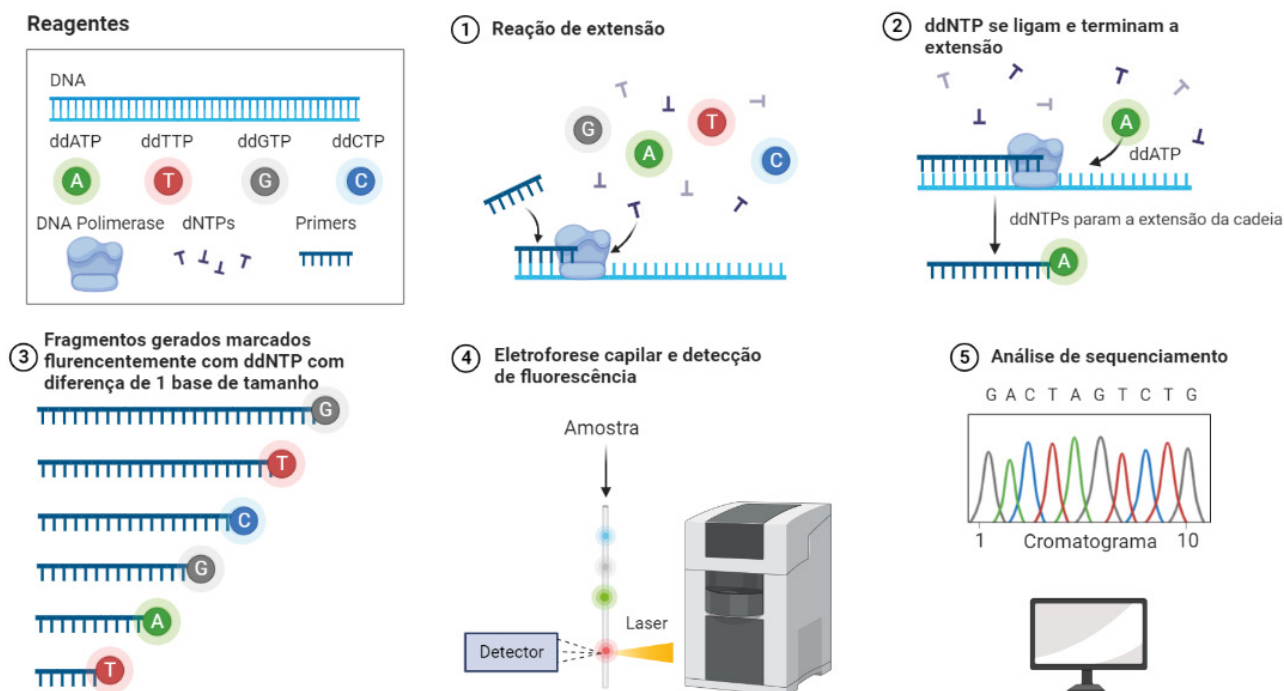


Figura 2 Fluxo do sequenciamento pelo método de Sanger.

Essa tecnologia foi utilizada no projeto para o sequenciamento do genoma humano.

Apesar de ser considerado o padrão ouro das técnicas de sequenciamento, ela é limitada pelo tamanho de fragmento que consegue sequenciar por reação (no máximo 1000 bases) e pelo custo de sequenciamento por base que ainda é bastante elevado. Esta técnica ainda é muito utilizada para sequenciar regiões específicas do DNA, por exemplo no caso da pesquisa de uma variante de ponto.

Porém, os métodos de sequenciamento massivo mais recentes tornaram o tempo de sequenciamento de DNA mais rápido, juntamente com a redução dos custos.

Esses métodos também chamados de métodos de sequenciamento de larga escala ou de nova geração (NGS)

tornaram os testes de DNA em larga escala acessíveis a um público mais amplo, pois exigem apenas alguns dias para analisar um teste de genoma e ainda produzem resultados de alta qualidade (Garrido-Cardenas, J., et al, 2017; <https://sequencing.com/educationcenter/whole-genome-sequencing>)

NGS (Next Generation Sequencing - Sequenciamento de Próxima geração)

Com a publicação da primeira versão do genoma humano (Venter et al., 2001), observou-se um avanço nas tecnologias de sequenciamento.

Existem diversas tecnologias que realizam o sequenciamento do DNA em larga escala. A Roche foi a primeira empresa a desenvolver esta estratégia, que está baseada em uma técnica chamada de pirosequenciamento. Outros métodos foram desenvolvidos: o Polony (Shendure et al., 2005) utilizado no sequenciador da marca SOLiD® (Applied Biosystems) e o método de amplificação em ponte (Bennett et al., 2005), que utilizado pelo sequenciador Genome Analyser®, da Illumina.

A Figura 3 apresenta a evolução das tecnologias disponíveis para o NGS.

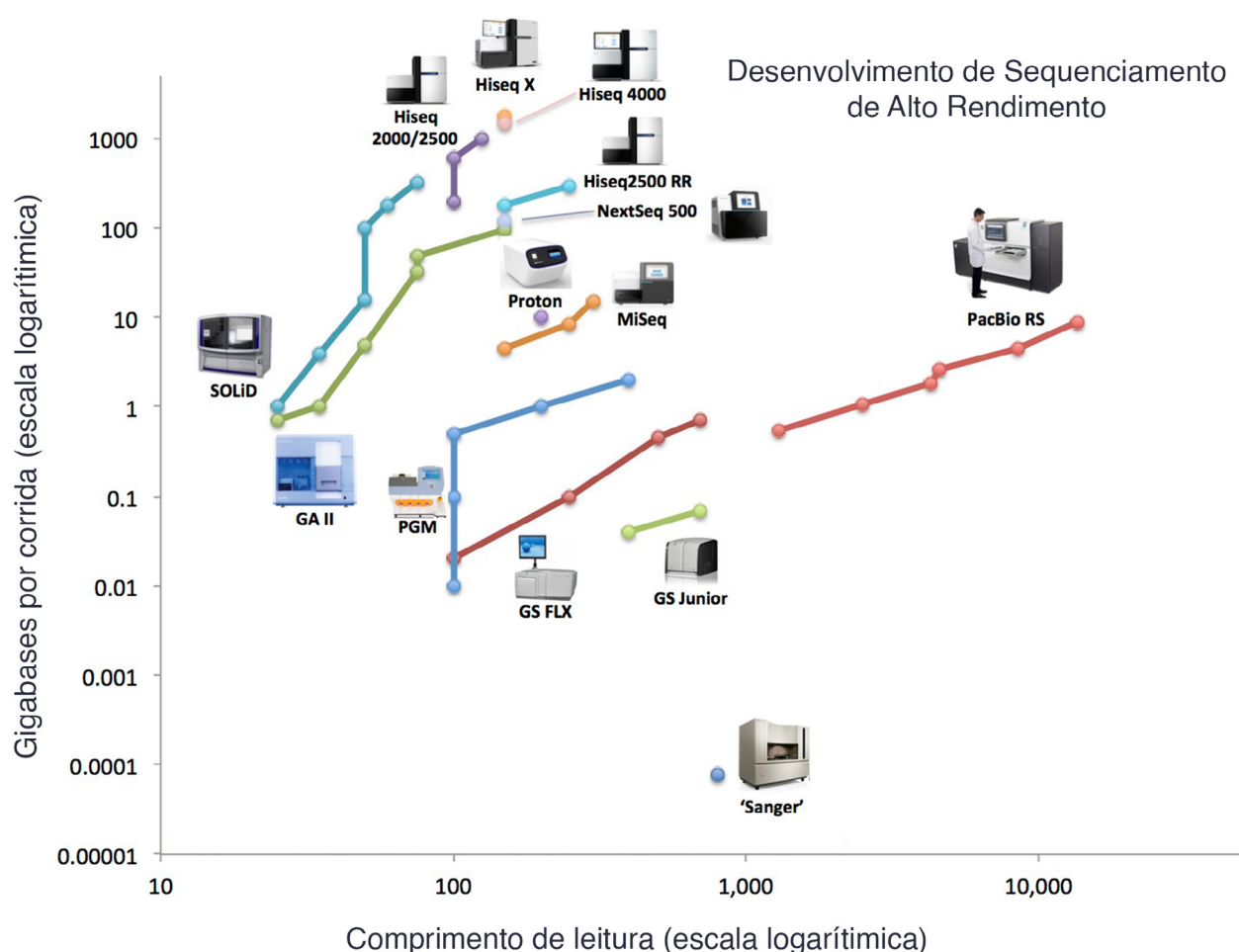


Figura 3 - Evolução das tecnologias do NGS (Next Generation Sequencing).
Adaptado de creativecommons.org/licenses/by/3.0

A maioria dos testes tumorais e para doenças cardiovasculares geneticamente determinadas atualmente é realizada com a tecnologia de NGS. Embora o sequenciamento Sanger de “primeira geração” tenha sido o padrão-ouro por anos em pesquisas e testes de laboratório clínico, o NGS suplantou amplamente o sequenciamento Sanger para pesquisa de câncer e uso de diagnóstico complementar em oncologia clínica e cardiologia.

Os protocolos de sequenciamento de NGS envolvem os seguintes passos: fragmentação do DNA, ligação de sequências específicas adaptadoras nas extremidades dos fragmentos gerados (chamados de tag), amplificados utilizando oligonucleotídeos específicos para as regiões adaptadoras e sequenciamento propriamente dito. No caso do Projeto Mapa Genoma Brasil, para o exoma (WES), o kit de preparo de biblioteca escolhido é baseado em “captura”, utilizando probes biotiniladas complementares às regiões exônicas.

A captura é feita através da hibridização das probes com os fragmentos amplificados na etapa anterior, seguida de purificação com beads com estreptavidina, que se liga fortemente com a biotina das probes. Esses fragmentos “capturados” são purificados e amplificados. Nesta última amplificação, são adicionados os indexes nas extremidades 5' e 3' de cada fragmento. Esses indexes são sequências de DNA específicas para a cada amostra e funcionam como identificadores após o sequenciamento, de forma que após término do preparo das bibliotecas, seja possível misturar as amostras para serem sequenciadas. Detalhes da técnica do sequenciamento de nova geração depende dos procedimentos fornecidos pelos fabricantes dos sequenciadores.

Um dos processos está evidenciado na figura 4.

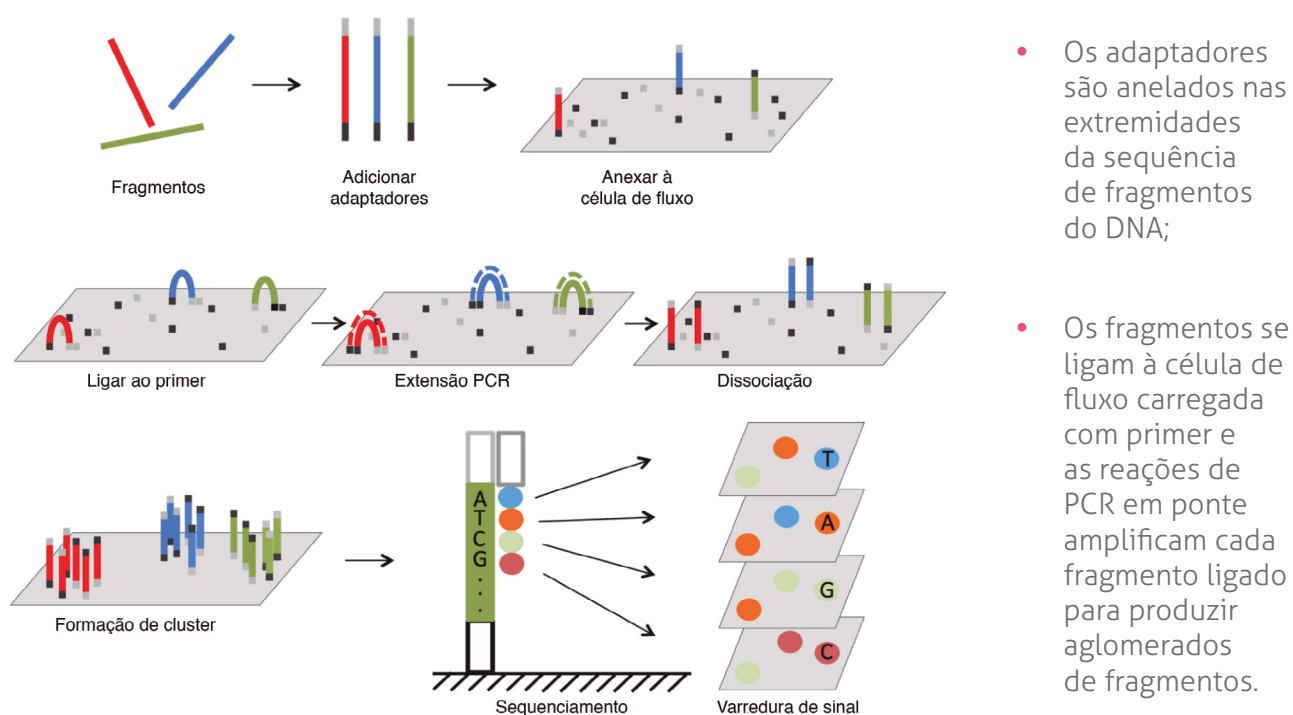


Figura 4 - Esquema do processo de sequenciamento pelo método Illumina.
Adaptado de Lu, Yuan, et al. 2016.

Durante cada ciclo de sequenciamento, um nucleotídeo ligado ao fluoróforo é adicionado ao fio em crescimento.

O laser excita os fluoróforos em todos os fragmentos que estão sendo sequenciados e um scanner óptico realiza a leitura.

O sequenciamento repetido ou redundante é geralmente necessário para garantir que cada nucleotídeo de uma determinada posição de DNA seja sequenciado de forma suficiente para distinguir mutações verdadeiras de NGS ou artefatos que podem ocorrer durante a criação de bibliotecas e o próprio processo de sequenciamento (Mansfield, A., et al, 2018).

A Figura 5 apresenta aplicações do NGS.

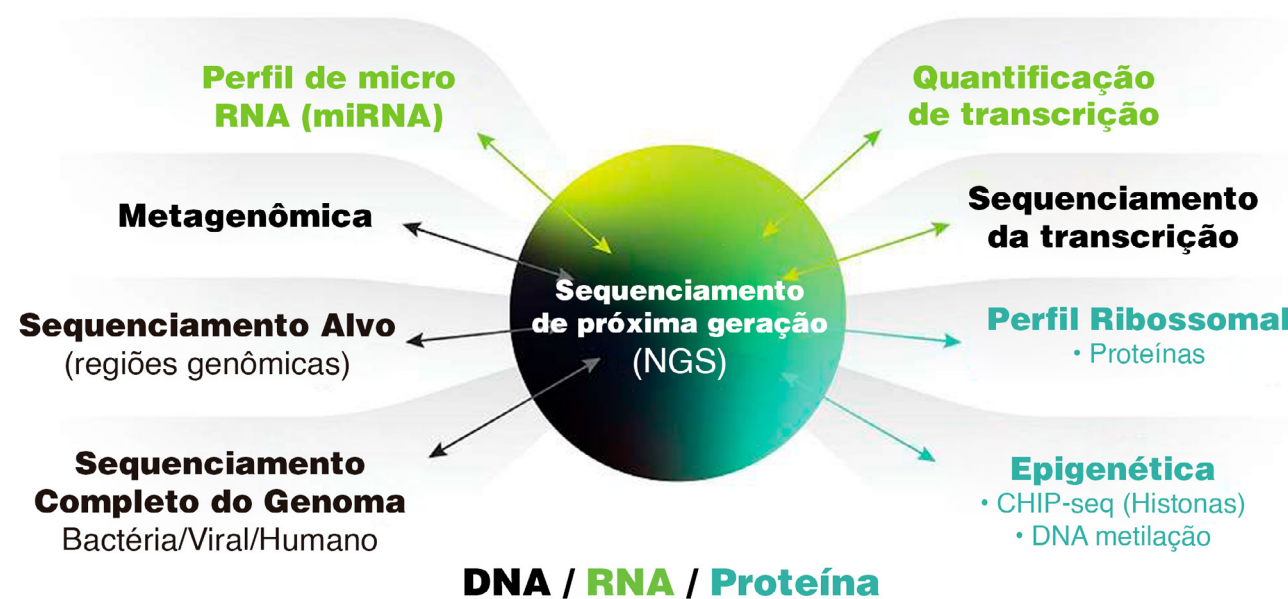


Figura 5. Aplicações do NGS.
Adaptado de Mentja et al. 2011

WES (Whole Exoma Sequencing) ou Sequenciamento Complexo do Exoma

O Exoma é o conjunto de todas as regiões codificadoras (exons) do DNA humano. Podemos ver na figura 7 que os éxons são as sequências de DNA que são transcritas em RNA, e assim, traduzidas em proteínas para que sua função seja desempenhada.

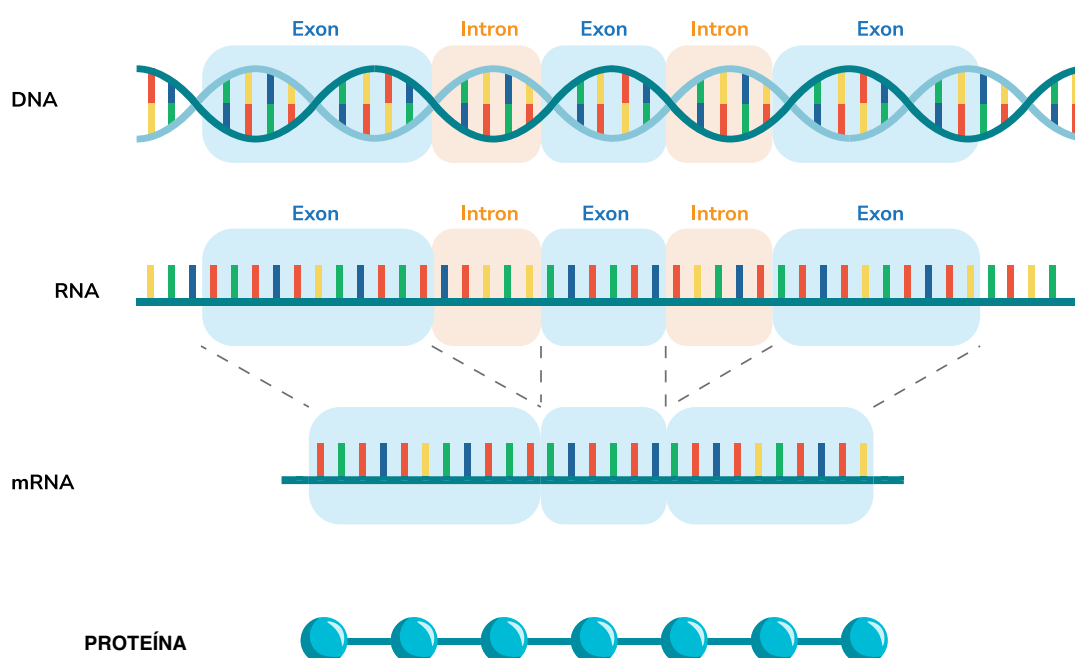


Figura 6 - Os éxons são as sequências de DNA transcritas em RNA e traduzidas em proteínas; os íntrons são regiões não codificantes.

O Exoma representa 1,5% do DNA total. Aparentemente pequeno em número, essa quantidade tem extrema importância, uma vez que a maioria das doenças genéticas estão relacionadas com variações (mutações) nos éxons.

Quando realizamos o WES, ou seja, o sequenciamento do exoma completo, é possível analisar, em média, cento e oitenta mil éxons com a finalidade de buscar as variantes que podem estar relacionadas com o fenótipo patológico de um indivíduo. Não é necessário selecionar genes alvos pois com esse teste genético é possível ter o sequenciamento de quase todos os vinte

mil genes, contribuindo para o diagnóstico de doenças que ainda não se tem uma hipótese diagnóstica bem definida ou por quadros inespecíficos que necessitem a busca de genes diferentes dos que existem em painéis comumente utilizados.

A técnica do sequenciamento de nova geração é utilizada para realizar o WES e detalhes da realização depende dos procedimentos fornecidos pelos fabricantes dos materiais. Um exemplo está sendo evidenciado na figura 7 onde podemos ver de forma mais simplificada o que acontece durante a realização dessa técnica.

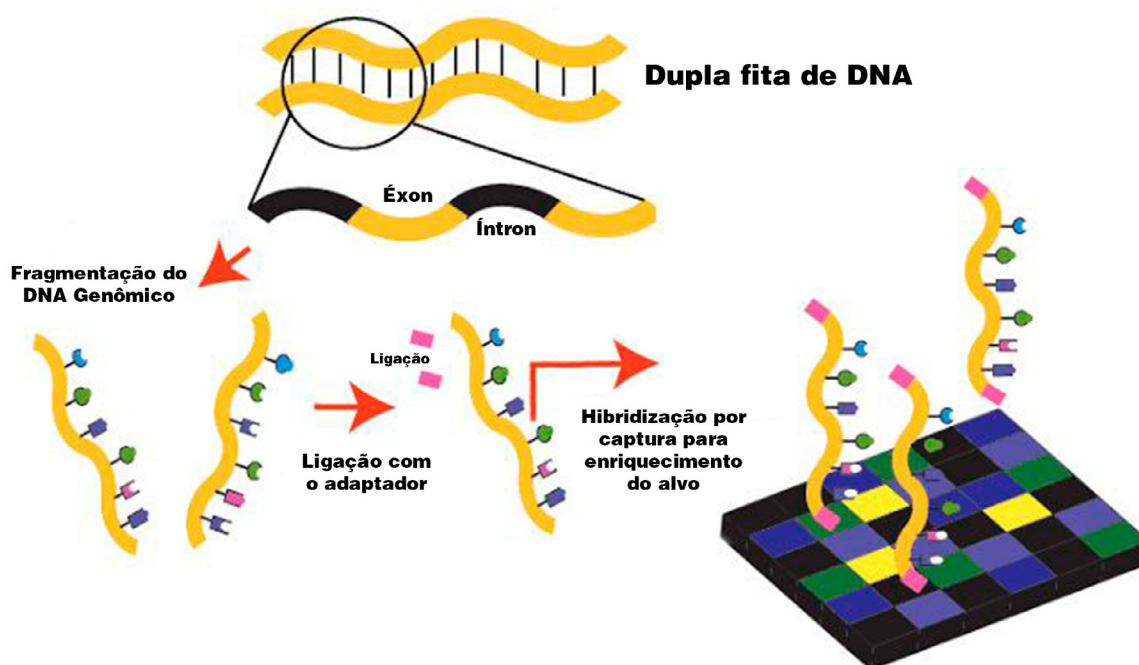


Figura 7 - WES (Whole Exoma Sequencing) ou Sequenciamento Completo do Exoma.
Adaptado de creativecommons.org/licenses/by/3.0

WGS (Whole Genome Sequencing ou Sequenciamento Completo do Genoma)

O sequenciamento do genoma inteiro, também conhecido como WGS, é uma técnica laboratorial na qual são obtidas todas as regiões codificantes (exons) e não codificantes do genoma.

Ele fornece um mapa completo e abrangente da composição genética de uma pessoa e permite que seja realizada uma análise extensa de todos os genes. O sequenciamento do genoma completo é uma tecnologia de teste genético que obtém dados abrangentes sobre cada gene.

Enquanto outros testes de DNA obtêm dados sobre um gene ou pontos dentro do seu DNA (microarranjos de genotipagem), o sequenciamento do genoma inteiro é diferente.

A Figura 8 apresenta algumas das informações que podem ser obtidas pelo WGS.

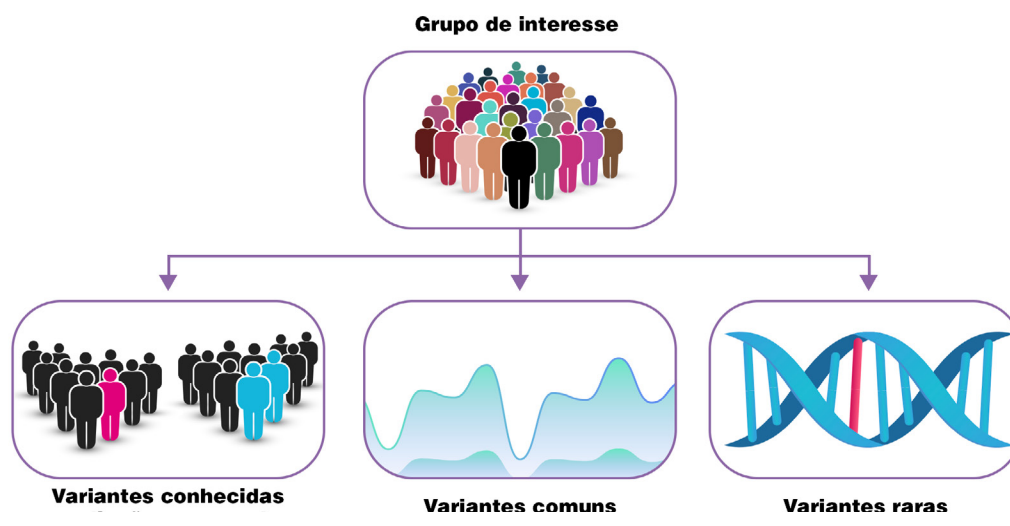


Figura 8 - Informações identificadas com o WGS.

O sequenciamento de nova geração, dentro da pesquisa genética em humanos, pode fornecer informações como diversidade genética, presença de elementos móveis no genoma, presença de genes adquiridos por transferência lateral, relações evolutivas, além de ser um teste capaz de identificar variantes de diferentes tipos: variantes de ponto, inserções, deleções e variantes de número de cópias.

O processo do WGS tem algumas fases:

- O sequenciamento;
- A montagem do genoma;
- Varredura;
- Anotação.

Um resumo do WGS está apresentado na Figura 9.

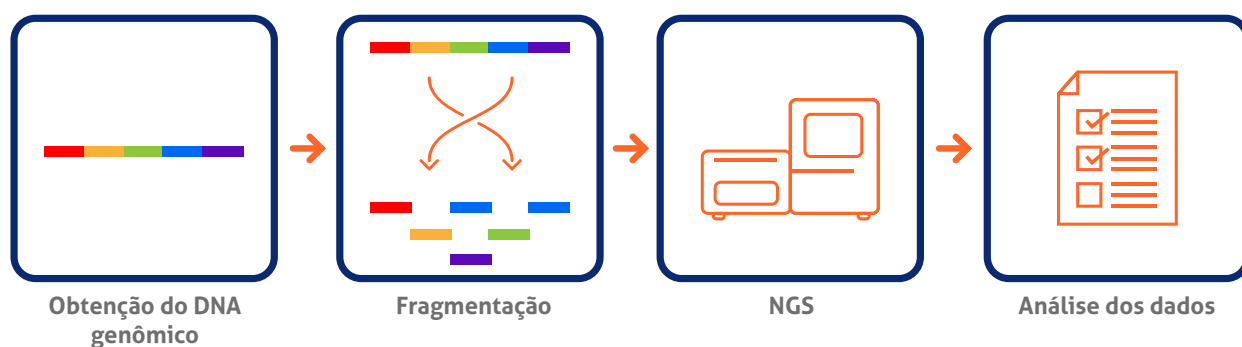


Figura 9 - Resumo das fases do WGS.

Após a obtenção dos fragmentos pelo sequenciamento, é necessário “montar o genoma”, ou seja, organizar o sequenciamento. O processo é realizado por programas de montagem (assemblers) que alinham os fragmentos (reads) gerados, baseando-se em regiões de sobreposição.

Antes da montagem, porém, deve ser a retirada que regiões que não fazem parte do genoma, tais como vetores e adaptadores. Após a organização dos fragmentos é obtida uma sequência única para genomas circulares, ou várias sequências contíguas, representando o número total de cromossomos de uma espécie. Em seguida, é realizada a predição genética que consiste numa varredura para buscar sequências correspondentes a cada um dos genes ou de outras regiões de interesse. Para isto, são utilizados programas de bioinformática que reconhecem os nucleotídeos que são característicos de cada elemento gênico (regiões promotoras, junção de éxons com íntrons, códons de início e parada na tradução, e o início das regiões 5’ e 3’ UTR [regiões não traduzidas]).

O processo de anotação é o próximo passo. Neste momento, o objetivo é descobrir os diversos elementos que estão em determinado genoma, e se extrai o máximo de informação biológica. Esta anotação pode ser automática, quando são utilizados programas de bioinformáticas, que tem a propriedade de anotar o conjunto gênico de um organismo de uma só vez. O outro

método de anotação é manual, pois é efetuada pelo anotador para cada gene de forma separada. O mais comum é vermos os dois tipos de anotação. A base do processo de anotação é comparar a sequência de cada transcrito (ou ORF), através de programas de alinhamento, com os bancos de dados disponíveis.

Uma das primeiras aplicações do WGS em oncologia foi a análise de amostras de leucemia mieloide aguda com citogenética sem alterações, em 2008. Nesta época, o uso de ferramentas de bioinformática que permitiriam a análise do genoma estava em seu início. Hoje, além da redução do custo para o WGS, as ferramentas de análise permitem avanços importantes (Zhao et al., 2019).

A utilização do WGS em oncologia proporciona oportunidades para a maior compreensão da biologia do tumor, com impacto na descoberta de drogas e no sucesso de estudos clínicos; e na avaliação de marcadores de resposta ao tratamento (Zhao et al., 2019). O genoma do câncer tem características complexas e padrões interrelacionados de variantes estruturais somáticas, o que expande a possibilidade de alterações direcionadoras (chamadas de “driver mutations”). Desde a descoberta do cromossomo Philadelphia, a caracterização de fusões em oncogenes tem sido central para o diagnóstico e tratamento.

Além de fusões, as alterações estruturais também modulam a expressão gênica pelos rearranjos do genoma não codificante (Zhao et al., 2019).

Amplificação Multiplex de Sonda Dependente de Ligação (MLPA)

O MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification ou Amplificação Multiplex de Sonda Dependente de Ligação) é uma técnica desenvolvida capaz de evidenciar a falta ou excesso de material genômico. De forma mais específica, são as alterações conhecidas como grandes deleções, amplificações e inserções no gene. O MLPA pode ser utilizado no diagnóstico molecular de diversas doenças genéticas cuja patogênese está relacionada à presença de deleções ou inserções de genes específicos.

A Figura 10 apresenta a técnica de MLPA.

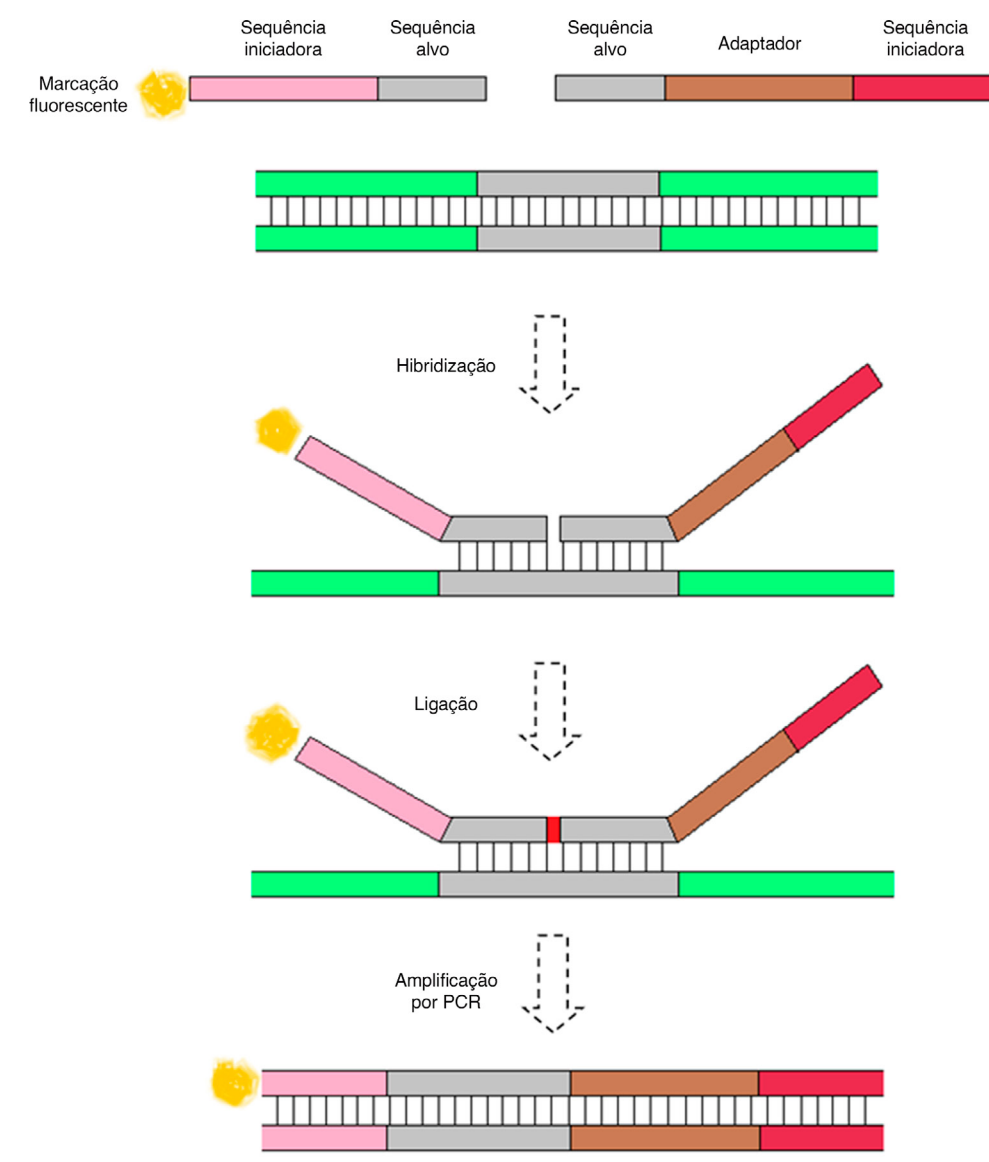


Figura 10 - Técnica de MLPA.
Adaptado de creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0

A correta caracterização das deleções e inserções é um ponto crucial para identificar a correlação genótipo-fenótipo. De fato, deleções ou inserções, de genes parciais ou inteiros, podem produzir um efeito fenotípico completamente diferente. Uma duplicação completa do gene pode levar a uma doença devido à presença de uma cópia extra do gene, enquanto uma duplicação parcial pode levar à perda da função dessa cópia do gene (Stuppia L., et al, 2012). As variantes genéticas podem ser muito diferentes entre si, podendo ser

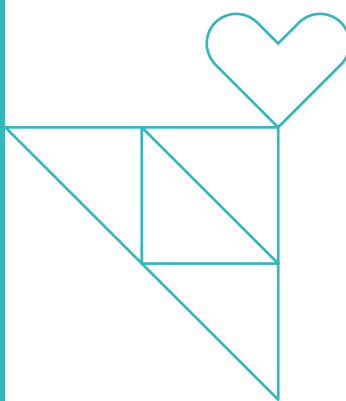
desde alterações menores como troca de uma única base ou até mesmo aquelas que envolvem deleções ou inserções de cromossomos e também aquelas que são maiores envolvendo questões estruturais como as duplicações ou deleções de até mesmo cromossomos inteiros.

Nesse sentido, os exames genéticos também precisam ser diferentes entre si para serem capazes de identificar as alterações. A tabela 2 demonstra a diferença entre as técnicas que discutimos até o momento.

	MLPA	Painel de um único gene ou diversos genes	Exoma completo	Genoma completo
Análise de todos os genes conhecidos	Não	Não	Sim	Sim
Análise de grandes deleções e duplicações	Sim	Não	Não	Sim
Análise de genes clinicamente mais relevantes	Não	Sim	Sim	Sim
Análise de achados incidentais	Não	Não	Sim	Sim

Tabela 2 - Diferença entre as técnicas moleculares com relação as respectivas análises

Como cada exame é focado em avaliar cada tipo de alteração, é importante o conhecimento do que cada técnica irá trazer como resposta e assim, avaliar a necessidade da realização de mais de uma técnica para a obtenção de respostas diagnósticas.



3. Implicações do teste genético

Consentimento para a realização do teste genético

As investigações genômicas são complexas e podem produzir vários resultados ao longo do tempo, à medida que diferentes perguntas são feitas sobre os mesmos dados, ou diferentes conhecimentos são utilizados no processo de interpretação.

É difícil aplicar noções de “consentimento informado” a uma situação em que os possíveis resultados são tão desconhecidos, tanto em virtude da individualidade dos dados genômicos inseridos, mas também devido à complexidade de navegar por esses dados para um “resultado”. A prática do consentimento na medicina evoluiu amplamente em torno de cenários mais simples, por exemplo, fazer ou não uma operação ou iniciar ou não uma medicação.

Os riscos são muitas vezes mais facilmente previstos e os resultados possíveis são mais claros. Ao tentar encaixar noções de consentimento derivadas dessas

situações no cenário dos testes genômicos, encontramos várias dificuldades. Em termos legais, para que o consentimento seja válido, os pacientes precisam ser devidamente informados sobre os objetivos do teste e o seu consentimento deve ser dado voluntariamente (Horton, R., Lucassen, A, 2019).

No campo dos testes genômicos, todos esses elementos estão indiscutivelmente em dúvida. Para que uma pessoa consiga tomar uma decisão particular, ela precisa ser capaz de compreender, reter e pesar as informações necessárias para decidir e comunicar seus desejos. Para testes genômicos, é duvidoso que alguém possa realmente atender a esses critérios – as ramificações dos testes genômicos podem ser imprevisíveis mesmo para pessoas que conhecem bem o campo. Por exemplo, James Watson foi uma das primeiras pessoas a ter seu genoma sequenciado e optou por ter suas informações redigidas (já que ele preferia não saber se tinha um genótipo associado a uma chance maior de desenvolver a doença de Alzheimer). No entanto, a partir das informações que foram colocadas em domínio público, foi possível inferir o genótipo de Watson, já que as informações não estavam suficientemente protegidas. Nas conversas de consentimento, os profissionais de saúde são encarregados de fornecer aos pacientes as informações que eles desejam

ou precisam para tomar uma decisão específica, mas no contexto da genômica, não devemos presumir que qualquer pessoa possa antecipar todas as prováveis ou sérias consequências potenciais dos testes. “Informar adequadamente” uma pessoa que está tomando uma decisão sobre testes genômicos é uma tarefa desafiadora. Por exemplo, a pesquisa indica que vários participantes do Projeto 100.000 Genomas têm uma lembrança imprecisa se escolheram ou não saber sobre riscos à saúde não relacionados à condição que os levou a ingressar no projeto. O que quer que tenham escolhido, muitas pessoas presumiram que seriam informadas se “algo importante” fosse encontrado. Apesar de um processo de consentimento detalhado, o que os pacientes achavam que concordavam às vezes era diferente do que seus médicos achavam que haviam concordado. Se o consentimento for julgado puramente pela compreensão e retenção de informações relevantes, não funcionou bem para esses pacientes. Muitas vezes, a participação em testes genômicos tem consequências mais amplas – por exemplo, ao acessar testes clínicos por meio do Projeto 100.000 Genomas, os participantes também concordam em disponibilizar seus dados para uso pela pesquisa e pela indústria (com várias salvaguardas). Algumas pessoas querem um diagnóstico clínico, mas podem ser reticentes sobre

o compartilhamento de dados – fazer dos dois um “pacote” mina a voluntariedade de seu consentimento? Podemos argumentar que um genoma não pode ser interpretado isoladamente: ele se baseia na comparação com controles “normais” e bancos de dados de variantes causadoras de doenças “anormais”, portanto, o compartilhamento de dados é parte integrante do processo de interpretação (Horton, R., Lucassen, A, 2019).

No entanto, um diagnóstico genômico faria uma grande diferença para várias pessoas e famílias, e exigir que as pessoas forneçam seus dados à indústria para buscar um diagnóstico desesperadamente necessário pode ser retratado como coercitivo (talvez especialmente porque mais da metade não obterá um diagnóstico por meio de testes genômicos, pelo menos a curto prazo).

Como podemos preparar processos de consentimento robustos para a era genômica? A variedade de resultados possíveis dos testes genômicos dá a impressão de que os testes genômicos devem se encaixar bem com a posição politicamente popular de que mais opções são sempre boas. No entanto, a complexidade da interpretação do teste genômico, o que significa que a escolha do paciente pode ser difícil de honrar diretamente, corre o risco de alimentar o medo de que, ao exercer seu julgamento sobre o que constitui um resultado

cl clinicamente significativo, clínicos e cientistas estejam sendo paternalistas (Horton, R., Lucassen, A, 2019).

A ideia de ‘amplo consentimento’ ganhou força em circunstâncias em que, em virtude da incerteza e diversidade de possíveis intervenções ou resultados, as pessoas podem consentir com base em acordo com princípios gerais que governam o que será feito, sem conhecer detalhes específicos do que será feito.

As pessoas que contribuem para os biobancos fornecem consentimento sob esse modelo, essencialmente optando por delegar decisões sobre quais pesquisas futuras serão feitas com suas amostras com base em algum conhecimento do que o processo de tomada de decisão envolveria.

O consentimento de uma pessoa pode ter implicações para uma variedade de outras: ao participar de testes genômicos, uma pessoa pode encontrar informações relevantes para seus parentes biológicos. Às vezes, isso pode estar abertamente relacionado à detecção da mesma variante BRCA1 causadora de doença rara em duas primas com câncer de mama de início jovem, e em essência, encontrará a mesma variante nos pais que os conectam.

Normalmente, solicitamos apenas o consentimento da pessoa que fornece uma amostra de DNA para teste (ou de seu representante, se menor de idade ou sem capacidade). Outros membros de sua família que podem ser diagnosticados por meio do teste não são questionados, embora em certas circunstâncias essa possibilidade seja explorada detalhadamente como parte do processo de consentimento. O “resultado genômico” de uma pessoa é muitas vezes ligado ao de seus parentes biológicos, independentemente de ser confortável ou conveniente do ponto de vista social. As noções de consentimento que conceituam os pacientes como inteiramente separados de sua família biológica são, portanto, passíveis de falhar. Consideramos que as informações genéticas hereditárias devem ser confidenciais para as famílias, não para os indivíduos (embora as consequências pessoais para uma determinada pessoa de ter uma variante específica devam ser confidenciais apenas para elas) (Horton, R., Lucassen, A, 2019).

É importante explorar isso antes dos testes genômicos, em parte para evitar as situações muito raras em que os pacientes não estão dispostos a compartilhar informações genéticas relevantes para a saúde com seus parentes biológicos, mas, mais comumente, para considerar como essa comunicação pode ser realizada se necessário. Ao oferecer testes genômicos a uma pessoa, temos que estar cientes de que potencialmente estamos testando outras pessoas também, sem consentimento.

Outro aspecto que requer um tratamento particularmente cuidadoso é a possibilidade de a interpretação do teste

genômico evoluir ou ser derrubada à medida que o conhecimento científico avança. As discussões de consentimento precisam trilhar um equilíbrio delicado entre deixar as coisas em aberto, de modo que os pacientes estejam cientes de que as coisas podem mudar, e não gerar uma expectativa de que os dados genômicos serão examinados rotineiramente novamente e os pacientes serão atualizados, se nenhum mecanismo estiver em vigor para garantir isso. Muitas vezes, há falta de clareza sobre quem pode ser responsável por contatar novamente os pacientes se novas informações surgirem, ou tiverem o potencial de surgir, de dados genéticos ou genômicos antigos. Qualquer responsabilidade parece estar em algum lugar entre os pacientes e os profissionais de saúde, com um resultado provável de que, em alguns casos, ninguém a vê como sua responsabilidade e, portanto, o contato nunca acontece (Horton, R., Lucassen, A, 2019).

Dada a complexidade e a natureza evolutiva da interpretação de testes genômicos, argumentamos que o consentimento para testes genômicos pode ser conceitualmente útil como uma conversa contínua, onde aspectos da discussão são revisitados

conforme necessário ao longo da vida de uma pessoa. No entanto, em vez de confiar no consentimento (embora contínuo) para “fazer todo o trabalho”, consideramos que precisaremos estar situados dentro de um sistema confiável, onde os pacientes possam ter confiança de que seus dados genômicos serão tratados com cuidado e que suas preferências sejam acomodadas o máximo possível sem a necessidade de especificar antecipadamente exatamente o que será procurado ou encontrado. Encontrar um equilíbrio adequado entre reabrir as discussões quando necessário e se intrometer inesperadamente na vida das pessoas para fazer perguntas potencialmente indesejadas será claramente difícil.

No entanto, achamos que essa abordagem nos aproximaria do consentimento válido, do que tratar o consentimento como um evento único e aproximar as respostas para toda e qualquer pergunta subsequente, observando qualquer formulário que o paciente preencheu naquele dia (Horton, R., Lucassen, A, 2019).

Assim, os testes genômicos apresentam um desafio às noções tradicionais de consentimento e autonomia: como uma pessoa pode consentir em um processo

em que os resultados potenciais são tão desconhecidos e imprevisíveis, e como uma pessoa pode determinar independentemente como seu genoma é testado quando os interesses de seus parentes biológicos podem ser inextricavelmente dependentes de suas decisões? Argumentamos que nossos conceitos de consentimento e autonomia precisam se expandir para se adequarem ao propósito na era da genômica.

Em particular, sugerimos que o consentimento para testes genômicos precisa ser considerado como um consentimento mais amplo do que específico, bem como parte de uma conversa em andamento com espaço para abrir mais discussões quando necessário, em vez de ser pensado como um evento bloqueado no tempo. Também argumentamos que os conceitos relacionais de autonomia oferecem uma maneira mais frutífera de se envolver com as realidades dos testes genômicos.

Em um nível biológico, uma pessoa compartilha seu código genético com seus parentes próximos e, em um nível social, uma pessoa que opta por se submeter a testes genômicos se envolve em um processo que exige que outros usem sua experiência e habilidade para interpretar o código genético desse indivíduo. Considerar como podemos fortalecer as redes e relacionamentos que facilitam as escolhas em relação aos testes genômicos é um aspecto importante para aumentar a autonomia e um pré-requisito de preparação ética para a era genômica (Horton, R., Lucassen, A, 2019).

Achados secundários ou incidentais

O crescente uso e recursos de ferramentas genômicas, como sequenciamento de genoma e do exoma, levantam questões importantes sobre como lidar com informações genômicas relacionadas à saúde que podem fornecer dados sobre predisposição genética a alguma doença mas não estão relacionadas às razões pelas quais o teste foi solicitado.

As questões sobre se – e como – divulgar esses achados secundários (também chamados de achados incidentais) de testes genéticos geraram muito debate. Esses achados são chamados de secundários ou incidentais. Basicamente achados incidentais são variantes genéticas encontradas em um gene não relacionado ao quadro clínico do paciente e à intenção primária do teste genético. Por exemplo, uma paciente com hipertrofia cardíaca familiar, histórico de morte súbita na família, fez um exoma para pesquisa de variantes genéticas associadas a cardiomiopatia hipertrófica.

No seu laudo genético vieram reportadas duas variantes: uma variante patogênica no gene MYH7 (que causa cardiomiopatia hipertrófica), e outra variante patogênica no gene BRCA2 que aumenta a predisposição de câncer de mama e ovário. Porque a variante no BRCA2 foi reportada? O Colégio Americano de Genética Médica e Genômica publicou em 2015 recomendações para achados incidentais em exomas e genomas clínicos que é baseada na acionabilidade médica associada a predisposição de

uma determinada condição, ou seja, caso o paciente se beneficiasse daquela informação genética pois seria possível tomar medidas preventivas ou terapêuticas.

A presença de um achado incidental significa que o paciente possui um risco maior de desenvolver uma condição médica específica, porém não significa que o paciente possui a doença ou que irá desenvolvê-la definitivamente.

Os achados incidentais são reportados apenas em genes recomendados pelo consenso do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica.

Desde a publicação dessa recomendação, a lista de genes de achados incidentais foi atualizada a medida que o estudo de associação de genótipos e fenótipos foi aumentando, e cada vez mais se conhecendo genes associados a um pior diagnóstico ou desenvolvimento de tratamentos gene-específicos. Segue a lista mais atualizada (Green et al., 2013; Kalia et al., 2017; Miller et al., 2021, 2022).

Tabela 3 - Genes de achados incidentais recomendados pela ACMG SF3.1

Genes relacionados a câncer				
Fenótipo	ACMG SF Versão da lista	Gene	Modo de herança	Variantes para reportar
Polipose Adenomatosa Familiar	1.0	APC	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Câncer medular de tireóide familiar	1.0	RET ^b	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome hereditária para câncer de mama e ovário	1.0	BRCA1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	BRCA2		
	3.0	PALB2		
Feocromocitomas-paraganglioma hereditário	1.0	SDHD	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	SDHAF2		
	1.0	SDHC		
	1.0	SDHB		
	3.0	MAX		
	3.0	TMEM127		
Síndrome da Polipose Juvenil	2.0	BMPR1A	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	2.0	SMAD4 ^c		
Síndrome de Li-Fraumeni	1.0	TP53	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome de Lynch	1.0	MLH1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
		MSH2		
		MSH6		
		PMS2		
Neoplasia endócrina múltipla tipo I	1.0	MEN1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome de polipose de MUTYH	1.0	MUTYH	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
Neurofibromatose tipo 2	1.0	NF2	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome de Peutz-Jeghers	1.0	STK11	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome do tumor hamartoma-PTEN	1.0	PTEN	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Retinoblastoma	1.0	RB1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Complexo da esclerose tuberosa	1.0	TSC1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	TSC2		
Síndrome de von Hippel-Lindau	1.0	VHL	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Tumor de Wilms 1	1.0	WT1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas

Genes associados a fenótipos cardiovasculares

Fenótipo	ACMG SF Versão da lista	Gene	Modo de herança	Variantes para reportar
Aortopatias	1.0	FBN1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	TGFBR1		
	1.0	TGFBR2		
	1.0	SMAD3		
	1.0	ACTA2		
	1.0	MYTH11		
Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (uma subcategoria de Cardiomiopatia arritmogênica)	1.0	PKP2	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	DSP		
	1.0	DSC2		
	1.0	TMEM43		
	1.0	DSG2		
Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica	1.0	RYR2	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	3.0	CASQ2	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
	3.0	TRDN	Autossômica recessiva	
Cardiomiopatia dilatada	1.0	TNNT2	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	LMNA		
	3.0	FLNC		
	3.0	TTN		
	3.1	BAG3		
	3.1	DES		
	3.1	RBM20		
	3.1	TNNC1		
Síndrome de Ehlers-Danlos, tipo vascular	1.0	COL3A1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Hipercolesterolemia familiar	1.0	LDLR	SD	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	APOB	Autossômica dominante	
	1.0	PCSK9	Autossômica dominante	
Cardiomiopatia hipertrófica	1.0	MYH7d	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	MYBPC3		
	1.0	TNNI3		
	1.0	TPM1		
	1.0	MYLE		
	1.0	ACTC1		
	1.0	PRKAG2		
	1.0	MYL2		
Síndrome do QT longo tipos 1 e 2	1.0	KCNQ1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	KCNH2		
Síndrome do QT longo 3, síndrome de Brugada	1.0	SCN5A ^d	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas

Genes associados a erros inatos do metabolismo

Fenótipo	ACMG SF Versão da lista	Gene	Modo de herança	Variantes para reportar
Deficiência de biotinidase	3.0	BTD	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
Doença de Fabry	1.0	GLA	Ligada ao Cromossomo X	All hemi, het, homozygous P and LP
Deficiência da ornitina transcarbamilase	2.0	OTC	Ligada ao Cromossomo X	All hemi, het, homozygous P and LP
Doença de Pompe	3.0	GAA	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)

Genes relacionados a fenótipos diversos

Fenótipo	ACMG SF Versão da lista	Gene	Modo de herança	Variantes para reportar
Hemocromatose hereditária	3.0	HFE	Autossômica recessiva	Apenas HFE p.C282Y homozigoto
Telangiectasia hemorrágica hereditária	3.0	ACVRL1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	3.0	ENG		
Hipertermia maligna	1.0	RYR1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	CACNA1S		
Diabetes de início na maturidade dos jovens	3.0	HNF1A	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Retinopatia associada a RPE65	3.0	RPE65	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
Wilson disease	2.0	ATP7B	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
Amiloidose hereditária TTR	3.1	TTR	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas

No projeto Mapa Genoma Brasil faremos o exoma e genoma clínico de diversos pacientes com câncer e doenças cardiovasculares. Pode acontecer de algum paciente ser testado devido a uma condição clínica específica e ter variante patogênica em algum dos genes listados na tabela acima e que não tem relação a sua doença.

Como proceder nesses casos?

Primeiramente, no primeiro atendimento do paciente com o assistente de pesquisa do projeto esse assunto deve ser abordado e deve ser explicado ao participante que existe a possibilidade de ser encontrado esses achados indocidentais.

O participante deve optar se ele quer ou não quer ser notificado caso isso aconteça.

Segue abaixo trecho do termo de consentimento livre e esclarecido do projeto:

O teste genético consiste na análise de centenas de genes do seu DNA para a busca de alterações que possam estar relacionadas com as doenças cardiovasculares que estudamos. Durante essa análise, a equipe do projeto pode encontrar alterações em genes que não estavam procurando; isso se chama "achado incidental". Esses achados inesperados não estão diretamente relacionados com o estudo, no entanto, podem indicar alguma informação importante sobre a sua saúde. Por vezes os pesquisadores podem não saber o significado de um achado nem como ele pode afetar a sua vida ou a sua saúde de uma maneira geral.

Pode ser um benefício saber o resultado dos achados incidentais. Por exemplo, eles podem indicar o risco de desenvolver uma doença. Em alguns casos, isso permite tomar medidas para reduzir o seu risco e em outros casos, a informação pode ajudá-lo a tomar decisões na sua vida. Entretanto, receber informação inesperada sobre a sua saúde pode causar-lhe um grande desconforto emocional. Isso pode dar-se particularmente no caso de saber que tem ou pode desenvolver um problema para o qual não há tratamento ou cura. A opção de ter acesso a informação sobre os achados incidentais é exclusivamente sua. De qualquer forma, a equipe do projeto estará disponível para esclarecer todas as dúvidas sobre os achados incidentais e sobre como você deve proceder caso algum achado seja encontrado.

Você gostaria de ser notificado e receber um laudo com as informações de achados incidentais, caso esses sejam encontrados durante seu teste genético?

() Sim () Não

Após a realização do teste genético, você receberá o seu laudo impresso com o resultado da análise e um profissional da saúde participante do projeto prestará todas as informações sobre o resultado e estará disponível para tirar todas as dúvidas que você tiver.

Caso o participante queira ser informado acerca de achados secundários, essa informação constará em seu laudo e será realizado aconselhamento genético sobre essa questão também. Caso ele opte por não, os achados secundários não serão informados ao participante. As implicações clínicas dos achados incidentais devem ser discutidas em consulta de aconselhamento genético com um especialista.

Referências

- American Cancer Society. www.cancer.org/healthy/cancer-causes/genetics/genetic-testing-for-cancer-risk/understanding-genetic-testing-for-cancer.html Acessado em 26 de agosto de 2022.
- American Medical Association. Genetic Testing. Retrieved 2019. <https://www.ama-assn.org/delivering-care/precision-medicine/genetic-testing>
- Burke W. Genetic testing. *N Engl J Med* 2002;347(23):1867-75.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511:543-50.
- Carvalho CM, Zhang F, Lupski JR. Evolution in health and medicine. Sackler colloquium: Genomic disorders: a window into human gene and genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (Suppl 1): 1765-71.
- Freitas, Anderson & Pinto, Helber. (2021). Sequenciamento NGS: Status e Perspectivas. 10.51780/978-6-599-275326-04.
- Robson M, et al. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol* 2015;1:3660-7.
- <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genetic-Testing>. Acessado em 27 de julho de 2022.
- <https://www.cancer.org/healthy/cancer-causes/genetics/genetic-testing-for-cancer-risk/understanding-genetic-testing-for-cancer.html> Acessado em 27 de julho de 2022.
- Horton, R., Lucassen, A. Consent and Autonomy in the Genomics Era. *Curr Genet Med Rep* 2019;7:85-91.
- Holtzman NA, Watson MS. Promoting safe and effective genetic testing in the United States. Final report of the Task Force on Genetic Testing. *J Child Fam Nurs* 1999;2:388-90.
- Khoo C, Rogers TM, Fellowes A, Bell A, Fox S. Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond. *Transl Lung Cancer Res*. 2015 Apr;4(2):126-41. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.01.10. PMID: 25870795; PMCID: PMC4384221.
- Li H, Liu ZY, Wu N, Chen YC, Cheng Q, Wang J. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer*. 2020 Jun 20;19(1):107. doi: 10.1186/s12943-020-01227-0. PMID: 32563252; PMCID: PMC7305609.
- Lynce, F., Isaacs, C. How Far Do We Go with Genetic Evaluation? Gene, Panel, and Tumor Testing. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2016;35:72-8.
- Phillips, K., et al. Genetic Test Availability and Spending: Where Are We Now? Where Are We Going? *Health Aff (Millwood)* 2018;35:710-6.
- Garrido-Cardenas, J., et al. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors (Basel)* 2017;17:588-603.
- <https://sequencing.com/education-center/whole-genome-sequencing> acessado em 27 de julho de 2022.
- Mansfield, A., et al. Identification, Prioritization, and Treatment of Mutations Identified by Next-Generation Sequencing. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, v.38, 2018, p.873-880.
- Nakagawa H, Fujita M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. *Cancer Sci* 2018;109(3):513-22.
- Pritchard D, Goodman C, Nadauld LD. Clinical Utility of Genomic Testing in Cancer Care. *JCO Precis Oncol* 2022;6:e2100349.
- <https://www.cd-genomics.com/blog/sanger-sequencing-introduction-principle-and-protocol> acessado em 28 de julho de 2022.
- <https://sequencing.com/blog/post/what-is-whole-genome-sequencing-wgs> acessado em 28 de julho de 2022.
- Schienda J, Stopfer J. Cancer Genetic Counseling-Current Practice and Future Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020 Jun 1;10(6):a036541. doi: 10.1101/cshperspect.a036541. PMID: 31548230; PMCID: PMC7263095.
- Smith LP. The Spectrum of Genetic Testing. *Semin Oncol Nurs*. 2019 Feb;35(1):11-21. doi: 10.1016/j.soncn.2018.12.008. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30660358.
- Stuppia L., et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci*, v.13, 2012, p.3245-76
- <https://www.breastcancer.org/genetic-testing/family-relationships> acessado em 28 de julho de 2022.
- Zhao EY, Jones M, Jones SJM. Whole-Genome Sequencing in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*

2019;9:a034579.

https://medicine.uiowa.edu/humangenetics/sites/medicine.uiowa.edu/humangenetics/files/wysiwyg_uploads/IIHG_Testing_Proof3%20FINAL%202018.pdf

Lu, Yuan, et al. "Next generation sequencing in aquatic models." *Next Generation Sequencing-Advances, Applications and Challenges* 1 (2016): 13.)

Ackerman, M. J. et al. (2011) 'HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA).', *Heart rhythm*. Elsevier Inc., 8(8), pp. 1308–39. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.05.020.

Adams, D. et al. (2016) 'First European consensus for diagnosis, management, and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy.', *Current opinion in neurology*. Wolters Kluwer Health, 29 Suppl 1(Suppl 1), pp. S14–26. doi: 10.1097/WCO.0000000000000289.

Ahmad, F. et al. (2019) 'Establishment of Specialized Clinical Cardiovascular Genetics Programs: Recognizing the Need and Meeting Standards: A Scientific Statement From the American Heart Association', *Circulation*. Genomic and precision medicine. NLM (Medline), 12(6), p. e000054. doi: 10.1161/HCG.0000000000000054.

Cambien, F. and Tired, L. (2007) 'Genetics of cardiovascular diseases: From single mutations to the whole genome', *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1714–1724. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.661751.

Dainis, A. M. and Ashley, E. A. (2018) 'Cardiovascular Precision Medicine in the Genomics Era', *JACC: Basic to Translational Science*. Elsevier Inc, pp. 313–326. doi: 10.1016/j.jacbts.2018.01.003.

den Dunnen, J. T. et al. (2016) 'HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update', *Human Mutation*. John Wiley and Sons Inc., 37(6), pp. 564–569. doi: 10.1002/humu.22981.

Green, R. C. et al. (2013) 'ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. NIH Public Access, 15(7), p. 565. doi: 10.1038/GIM.2013.73.

Inoue, K. and Lupski, J. R. (2002) 'Molecular mechanisms for genomic disorders', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. Annu Rev Genomics Hum Genet, pp. 199–242. doi: 10.1146/annurev.genom.3.032802.120023.

Kalia, S. S. et al. (2017) 'Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics', *Genetics in Medicine*. Nature Publishing Group, 19(2), pp. 249–255. doi: 10.1038/gim.2016.190.

Miller, D. T. et al. (2021) 'ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)', *Genetics in Medicine*. Elsevier, 23(8), pp. 1381–1390. doi: 10.1038/S41436-021-01172-3.

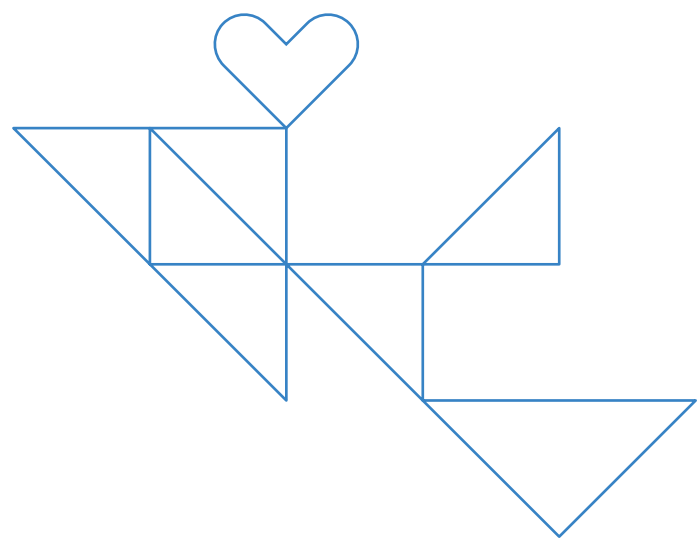
Miller, D. T. et al. (2022) 'ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)', *Genetics in Medicine*. Elsevier, 24(7), pp. 1407–1414. doi: 10.1016/J.GIM.2022.04.006.

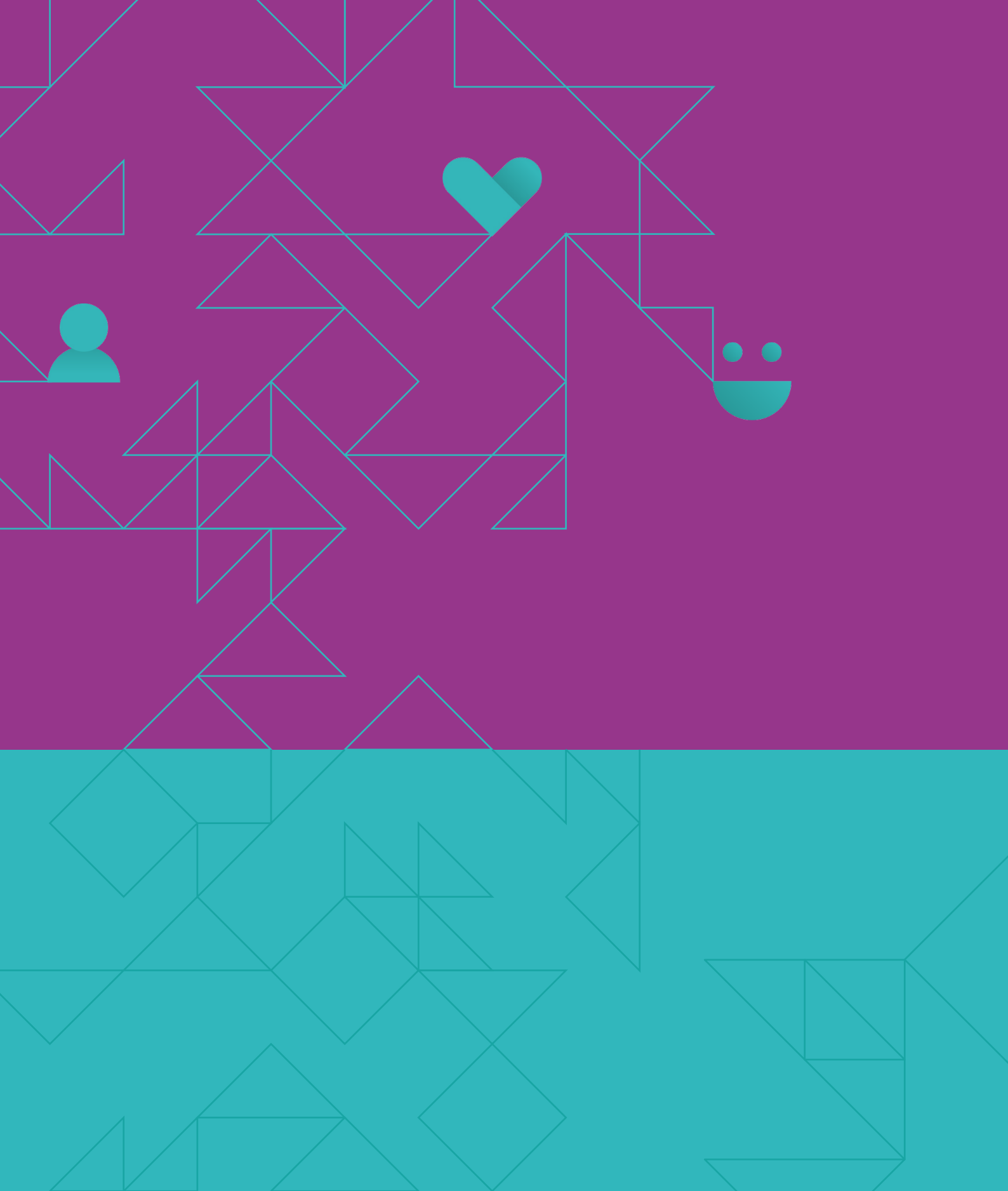
Otto, C. M., Savla, J. J. and Hisama, F. M. (2020) 'Cardiogenetics: A primer for the clinical cardiologist', *Heart*. BMJ Publishing Group, 106(12), pp. 938–947. doi: 10.1136/heartjnl-2019-316241.

Richards, S. et al. (2015) 'Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology'. doi: 10.1038/gim.2015.30.

Shen, H. et al. (2013) 'Comprehensive Characterization of Human Genome Variation by High Coverage WholeGenome Sequencing of Forty Four Caucasians', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 8(4). doi:10.1371/journal.pone.0059494.

Stiles, M. K. et al. (2021) '2020 APhRS/HRS expert consensus statement on the investigation of decedents with sudden unexplained death and patients with sudden cardiac arrest, and of their families', *Heart Rhythm*. Elsevier B.V., 18(1), pp. e1–e50. doi: 10.1016/j.hrthm.2020.10.010.





Rua Maestro Cardim, 769
01323-900 Bela Vista São Paulo
Tel. 11 3505 1000

     [/bporgbr](https://bporgbr)
bp.org.br