



Saúde em Debate

ISSN: 0103-1104

ISSN: 2358-2898

Centro Brasileiro de Estudos de Saúde

Pacheco, Christina; Ceccatto, Vânia Marilande; Maia, Cynthia Moreira;
Rosa, Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury; Leite, Cícilia Raquel Maia
Pesquisa translacional na era pós-genômica: avanços na área da transcriptômica
Saúde em Debate, vol. 43, núm. 2, Esp., 2019, pp. 169-180
Centro Brasileiro de Estudos de Saúde

DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-11042019S213>

Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=406369189014>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais informações do artigo
- Site da revista em redalyc.org

Pesquisa translacional na era pós-genômica: avanços na área da transcriptômica

Translational research in the post-genomic era: advances in the field of transcriptomics

Christina Pacheco¹, Vânia Marilande Ceccatto ², Cynthia Moreira Maia¹, Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa³, Cicília Raquel Maia Leite¹

DOI: 10.1590/0103-110420195213

RESUMO A pesquisa translacional envolve a interface entre a pesquisa básica e a clínica médica com o intuito de gerar produtos ou processos inovadores para introduzi-los nos protocolos clínicos e nos sistemas de saúde. O objetivo desse ensaio foi apresentar uma visão geral dos avanços da transcriptômica, subsidiados pela disponibilidade e utilização das novas tecnologias da informação e biologia molecular. Na busca pelo diagnóstico preciso e menos invasivo, testes transcriptômicos utilizam assinaturas de expressão gênica visando detectar doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), autoimunes (lúpus eritematoso sistêmico, granulomatose de Wegener), insuficiência cardíaca, autismo e câncer (de mama, colorretal, hepático e de pulmão). No sistema de saúde inglês as diretrizes clínicas incorporam oito testes transcriptômicos, todos com foco no câncer. No Brasil testes genômicos com base nas sequências de DNA são regulamentados para diagnosticar anomalias congênitas, tanto no Sistema Único de Saúde, como na saúde suplementar, mas os testes moleculares não avançaram no âmbito da transcriptômica diagnóstica. O sistema de saúde brasileiro deveria ir além dos testes de análise genômica e iniciar o processo de regulamentação das tecnologias transcriptômicas de diagnóstico. No futuro, testes diagnósticos avaliando múltiplos perfis de expressão gênica podem se transformar em exames de rotina numa forma de triagem molecular.

PALAVRAS-CHAVE Pesquisa médica translacional. Transcriptoma. Diagnóstico.

ABSTRACT *Translational research involves the interface between basic research and medical practice in order to generate innovative products or processes to introduce them into clinical protocols and health systems. The objective of this essay was to present an overview of transcriptomic advances, subsidized by the availability and use of new information technologies and molecular biology. In the search for accurate and less invasive diagnosis, transcriptomic tests use gene expression signatures to detect neurodegenerative diseases (Parkinson and Alzheimer), autoimmune (systemic lupus erythematosus, Wegener's granulomatosis), heart failure, autism and cancer (breast, colorectal, hepatic and lung). In the English health system the clinical guidelines incorporate eight transcriptomic tests, all with a focus on cancer. In Brazil genomic tests based on DNA sequences are regulated to diagnose congenital anomalies both in the Unified Health System and in supplementary health, but the molecular tests have not advanced in the scope of the diagnostic transcriptomics. The Brazilian health system should go beyond the tests of genomic analysis*

¹Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) – Mossoró (RN), Brasil.
christinaosvaldo@yahoo.com.br

²Universidade Estadual do Ceará (Uece) – Fortaleza (CE), Brasil.

³Universidade de Brasília (UnB) – Brasília (DF), Brasil.



and begin the process of regulation of transcriptomic diagnostic technologies. In the future, diagnostic tests evaluating multiple gene expression profiles may become routine exams in a form of molecular screening.

KEYWORDS *Translational medical research. Transcriptome. Diagnosis.*

Introdução

A pesquisa translacional envolve, em sua fase inicial, a transferência da tecnologia, em que os conhecimentos gerados nas ciências básicas levam à produção de novos produtos, como drogas, equipamentos, testes diagnósticos e opções de tratamento inovadoras. Nessa interface entre a pesquisa básica e a clínica médica, o intuito é a geração de um produto inovador e a sua introdução nos protocolos clínicos e nos sistemas de saúde. Outra fase da pesquisa translacional abrange a disseminação das inovações produzidas, garantindo que as novas tecnologias e o conhecimento gerado nas pesquisas atinjam o usuário final¹. Originária do conceito de '*bench to bedside*' (da bancada ao leito), a medicina translacional visa eliminar as barreiras entre os laboratórios de pesquisa e a prática clínica².

No âmbito da pesquisa genômica (e pós-genômica) translacional, a tradução dos conhecimentos científicos em avanços na prática clínica ainda representa um desafio. Recentemente, os cientistas têm focado na aplicação dos conhecimentos da genômica humana no setor da saúde, visando auxiliar no diagnóstico e no tratamento de doenças³. Voltando ao início dos estudos genômicos, o primeiro sequenciamento do genoma humano foi realizado por um consórcio internacional, custou milhões de dólares e demorou mais de uma década para que o esboço do genoma fosse publicado em 2001⁴. Após a elucidação da sequência do genoma humano, a imprensa e o público clamavam por respostas rápidas, como a medicina personalizada e o diagnóstico molecular de doenças de base genética (exame

genético do indivíduo para fins diagnósticos). Os avanços na genômica humana geraram altas expectativas e uma certa ‘ansiedade translacional’⁵. Cientistas se perguntavam: como chegar à tradução dos conhecimentos biomédicos básicos para a prática clínica?⁶.

A transferência da tecnologia com base nesses conhecimentos levou um certo tempo por conta da complexidade da informação genética, mas já está se tornando realidade. Segundo o fluxo ‘dados → informação → conhecimento’, pesquisadores do mundo inteiro têm-se esforçado para levar os avanços gerados na bancada ao leito hospitalar e ao sistema de saúde, desenvolvendo produtos acessíveis ao público. A tecnologia da informação é um instrumento indispensável na medicina translacional no que diz respeito às ciências ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica)⁶, pois o grande volume de dados torna a análise manual praticamente impossível.

A era pós-genômica iniciou-se há duas décadas, e desde então os equipamentos e as técnicas de sequenciamento têm evoluído rapidamente de modo a baratear o custo das análises e diminuir drasticamente o tempo necessário para o sequenciamento de um genoma completo. Vale ressaltar que enquanto dados genômicos são decisivos para o entendimento de patologias e efeitos de fármacos nos sistemas fisiológicos, a lacuna entre genótipo (carga genética do indivíduo) e fenótipo (características observáveis) pode ser estudada por meio da caracterização dos diferentes níveis ômicos, incluindo os níveis intermediários: transcriptoma (sequências e níveis de RNA), proteoma (o conjunto de proteínas presentes

na amostra), metaboloma (o conjunto de metabólitos)⁷. Além do sequenciamento do genoma (a sequência de DNA do indivíduo), variações nas metodologias permitem outras análises, como o sequenciamento e a quantificação dos transcritos (RNA) pela técnica de RNA-Seq⁸.

A imensa quantidade de dados biológicos gerados na última década por estudos transcriptônicos em larga escala depositados em bancos de dados biológicos públicos permite que estudos secundários sejam realizados gerando produtos viáveis que possam ser usados no diagnóstico molecular de doenças. É possível que determinados estados fisiológicos possam ser caracterizados por meio de assinaturas de expressão gênica⁹. Essas assinaturas de expressão são padrões de expressão gênica, conjuntos de genes ligados a doenças que podem ser usados como testes diagnósticos moleculares. Alguns desenvolvimentos recentes da transcriptômica translacional, em diversas áreas da medicina, serão descritos a seguir.

O objetivo deste trabalho foi apresentar uma visão geral dos avanços da área transcriptômica subsidiados pela disponibilidade e pela utilização das novas tecnologias da informação e de biologia molecular. A partir da metodologia denominada *design science*¹⁰, foram revistos os estudos transcriptônicos e apresentados exemplos de testes diagnósticos baseados em padrões de expressão gênica. As fragilidades dos estudos transcriptônicos foram ponderadas na seção seguinte, seguidas por uma descrição de tecnologias já incorporadas e regulamentadas.

Design science

Como forma de projetar as questões que nortearam este estudo, foi utilizado o modelo de *design science*, que busca compreender e identificar os principais pontos do estudo, fundamentado na resolução de problemas¹⁰. Nessa abordagem, tem-se a Questão Geral de Pesquisa (QGP), que pode ser categorizada em outras questões mais específicas; para o

presente estudo, foram consideradas quatro Questões Conceituais (QC). Portanto, a questão geral de pesquisa é:

QGP: como estão sendo usadas e disponibilizadas as novas tecnologias para diagnóstico molecular na área transcriptômica?

Dessa forma, a QGP enunciada acima pode ser decomposta nas seguintes questões de pesquisa conceituais apresentadas a seguir:

QC 1: quais são os meios para diagnóstico molecular na transcriptômica?

QC 1.1: quais testes de diagnóstico molecular estão em estágio de desenvolvimento?

QC 1.2: quais testes de diagnóstico molecular estão regulamentados?

QC 1.3: quais testes de diagnóstico molecular estão incorporados e são utilizados em sistemas de saúde semelhantes ao SUS?

Em *design science*, a estruturação do conjunto-problema de pesquisa é realizada por meio da decomposição das questões delineadas anteriormente, e a construção do conjunto-solução ocorre pela composição de soluções das questões. As soluções são apresentadas ao longo do trabalho.

Métodos de estudos transcriptômicos

Estudos transcriptônicos identificam e quantificam o RNA nos diferentes tecidos e em distintas condições fisiológicas. As técnicas mais usadas pelos estudos transcriptônicos são: RT-qPCR; *qPCR array*, microarranjos e RNA-Seq. A RT-qPCR ou Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa com transcrição reversa (*Reverse transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*) avalia a expressão gênica de forma pontual (gene a gene). O

arranjo de PCR quantitativa (*qPCR-array*) usa a RT-qPCR para avaliar mudanças na expressão de dezenas a centenas de genes. Microarranjos usam a hibridização de ácidos nucléicos para avaliar a expressão gênica. RNA-Seq emprega o sequenciamento para quantificar os transcritos. Todas essas técnicas (RT-qPCR, *qPCR-arrays*, microarranjos e RNA-Seq) apresentam os resultados em *fold-change* (indicando quantas vezes a concentração do RNA aumentou ou diminuiu), e seus dados podem ser usados em estudos comparativos, por exemplo, analisando as mudanças na expressão gênica decorrentes do exercício físico¹¹.

A técnica PCR convencional foi desenvolvida nos anos 1980 baseada na amplificação de fragmentos específicos do DNA¹². Essa técnica é capaz de detectar se o fragmento procurado está presente ou ausente na amostra em estudo, mas não quantifica o material genético na amostra. A técnica RT-PCR apresenta-se como uma variação da PCR convencional na qual o material genético é marcado com um reagente fluorescente e a detecção dessa fluorescência é realizada após cada ciclo de amplificação. Por conta da detecção ciclo a ciclo da fluorescência, a RT-qPCR é capaz de quantificar o material genético na amostra de forma comparativa, dando o resultado em *fold-change*, que indica quantas vezes a concentração do RNA encontra-se maior ou menor em uma amostra comparando a uma amostra controle. A RT-qPCR é uma análise pontual que avalia gene a gene. Já a técnica *q-PCR array* (arranjo de PCR quantitativo) é uma RT-qPCR na qual diversos genes são avaliados em paralelo. Usando *q-PCR array*, dezenas a centenas de genes podem ter seus níveis de expressão avaliados ao mesmo tempo.

A técnica de microarranjo de DNA complementar (*complementary DNA microarray*) baseia-se na hibridização de ácidos nucleicos, sendo um sistema capaz de detectar a expressão de uma grande quantidade de genes em paralelo. Milhares de sondas para os genes de interesse são aderidas a pontos específicos em um suporte sólido. Nessa técnica, duas

amostras de RNA (transformadas em DNA complementar), marcadas com fluorescências distintas, são avaliadas concomitantemente (teste vs. controle). De acordo com a fluorescência detectada, é possível aferir as concentrações relativas de transcritos nas amostras. Com o uso de microarranjos, é possível avaliar os padrões de expressão gênica complexos e desenvolver sensores para o uso em diagnósticos clínicos¹³.

RNA-Seq é uma técnica moderna de biologia molecular que usa o sequenciamento profundo de DNA complementar (produzido a partir do RNA) para a quantificação da expressão gênica diferencial. Após o sequenciamento, as sequências elucidadas são mapeadas usando o genoma de referência, a avaliação da presença e da quantidade de cada RNA pode ser calculada e comparada às quantidades em outra amostra sequenciada. Com a utilização de RNA-Seq, é possível aferir a presença e a prevalência de transcritos conhecidos e previamente desconhecidos⁸.

A imensa quantidade de dados biológicos gerados na última década por estudos transcriptômicos em larga escala depositados em bancos de dados biológicos públicos permite que estudos secundários sejam realizados gerando produtos viáveis que possam ser usados no diagnóstico molecular de doenças. Alguns desenvolvimentos recentes da transcriptômica translacional, em diversas áreas da medicina, serão descritos a seguir.

A transcriptômica translacional no desenvolvimento de testes diagnósticos

Na busca pelo diagnóstico preciso de enfermidades complexas, testes baseados no transcriptoma foram desenvolvidos para detectar diversas doenças. Entre as enfermidades com diagnóstico molecular baseado na expressão gênica, estão algumas doenças neurodegenerativas^{14,15}, autoimunes^{16,17}, cardiomiopatias^{18,19} e autismo^{20,21}.

Testes moleculares de doenças neurodegenerativas baseados no transcriptoma foram desenvolvidos para Alzheimer e Parkinson. Em 2014, a empresa Siemens Healthcare Diagnostics depositou a patente para um teste diagnóstico para o mal de Alzheimer, uma doença cujo diagnóstico precoce representa um desafio, já que os sintomas iniciais se assemelham a outras desordens neurológicas, bem como a processos naturais do envelhecimento. Os pesquisadores usaram a técnica de RNA-Seq para a análise da expressão gênica, especificamente de micro RNAs (miRNAs), e desenvolveram um teste diagnóstico em tecido sanguíneo que avalia o padrão de expressão de 10 miRNAs (marcadores moleculares para o mal de Alzheimer)¹⁴.

Padrões de expressão de miRNAs também podem ser utilizados para a detecção, o prognóstico e o acompanhamento do mal de Parkinson em amostras de sangue, soro ou pele. Em uma abordagem molecular baseada na expressão gênica, foi revelado um conjunto de 142 genes com perfil transcriptômico específico para a doença. O padrão de expressão desses miRNAs, quando comparados a indivíduos saudáveis, incluiu 72 genes com um nível de expressão aumentado e 70 genes apresentando uma expressão menor em indivíduos com o mal de Parkinson¹⁵.

Em 2006, a MetriGenic Corporation (Canadá) patenteou padrões transcriptônicos associados a doenças autoimunes, particularmente: lúpus eritematoso sistêmico, granulomatose de Wegener e vasculite anca positivo. Os testes incluíram a análise da expressão de um conjunto de 1.645 genes ou de subconjuntos deles, sendo capaz de realizar o diagnóstico diferencial das doenças autoimunes mencionadas. O ensaio desenvolvido ainda pode ser utilizado para classificar as doenças em subgrupos e predizer a apresentação dos sintomas de lúpus eritematoso sistêmico¹⁶.

A artrite reumatóide foi revista por Burska e colaboradores¹⁷, em que foram avaliados os métodos de diagnóstico, prognóstico e predição de resposta a terapias baseados na

expressão gênica. Os protocolos descritos incluíram testes transcriptônicos para o diagnóstico de artrite reumatoide e osteoartrite, bem como ensaios que diferenciaram entre artrite reumatoide e osteoartrite de acordo com o padrão de expressão gênica. Os pesquisadores avaliaram diversas assinaturas de expressão gênica, com comparações geralmente inconclusivas, e perceberam uma grande necessidade de harmonização dos métodos e protocolos de estudo para que padrões de expressão gênica tornem-se ferramentas diagnósticas na clínica médica.

Na esfera dos estudos transcriptônicos de cardiomiopatias, Liu e colaboradores¹⁹ utilizaram a tecnologia de RNA-Seq no tecido cardíaco de um grupo de seis voluntários (três no grupo controle, um paciente com cardiopatia isquêmica e dois com cardiomiopatia dilatada) para definir padrões de expressão visando detectar insuficiência cardíaca. Usando a assinatura gênica gerada, os pesquisadores testaram mais 313 amostras de tecido cardíaco e foram capazes de classificar a insuficiência cardíaca adequadamente.

Um estudo patrocinado pela empresa CardioDX (EUA), que contou com a participação de mais de mil voluntários, avaliou o transcriptoma sérico de indivíduos visando aperfeiçoar e validar um ensaio por RT-PCR para a detecção de doenças coronarianas. O padrão de expressão gênica no sangue dos pacientes (não diabéticos) foi avaliado usando um conjunto de 23 genes, e os resultados foram comparados a dados de angiografias coronárias. O teste desenvolvido, denominado ‘Corus CAD’, leva em consideração as diferenças biológicas entre os sexos, e é, portanto, sexo-específico. No geral, o teste apresentou sensibilidade de 85% e especificidade de 43%¹⁸. A sensibilidade de 85% encontrava-se em um bom patamar, mas a especificidade de 43% indicava uma alta taxa de resultados falso-positivos e refletia uma necessidade de aprimoramento do teste. A empresa obteve aprovação pela U.S. Food and Drug Administration (FDA), e ‘Corus CAD’ foi listado no rol de exames

oferecidos pelo seguro de saúde ‘Medicare’, do governo americano, entre 2012 e 2018. De acordo com uma reportagem do jornal ‘San Francisco Chronicle’, Medicare rescindiu a cobertura do teste ‘Corus CAD’ no final de 2018, julgando o teste desnecessário e de pouca usabilidade para os pacientes, o que levou a empresa Cardio DX a fechar suas portas no início de 2019²².

Hu²⁰ (2009) estudou linhagens celulares provenientes de amostras sanguíneas de gêmeos monozigóticos com diagnósticos diferentes na busca por um perfil molecular para a detecção do transtorno do espectro autista. Foi desenhado um método de microarranjo para triagem de transtornos do espectro autista avaliando a expressão gênica do indivíduo. O conjunto gênico para uso no diagnóstico inclui 25 genes mais expressos e 19 genes com um nível de expressão menor em indivíduos autistas²⁰. Outro teste baseado no transcriptoma para a detecção de transtornos do espectro autista foi patenteado por Kunkel e colaboradores²¹. O método de caracterização e diagnóstico de transtornos do espectro autista descrito na patente pode ser utilizado com amostras de cérebro, fluido espinhal ou sangue, em um sistema de análise de expressão gênica, com a avaliação de, pelo menos, 10 genes dentro de um rol de centenas de genes apresentados, seguido pela classificação do fenótipo molecular a partir de um algoritmo classificador²¹.

Tendo em vista a existência de um grande esforço no sentido do desenvolvimento de testes moleculares para o diagnóstico do câncer, estes serão apresentados em um item à parte.

Transcriptômica translacional do câncer

A literatura científica, bem como os bancos de patentes, revelou testes diagnósticos desenvolvidos para detectar alguns tipos de câncer analisando os padrões transcriptônicos. Diversos testes estão sendo desenvolvidos, entre eles, alguns que visam detectar o câncer de mama,

colorretal, hepático e de pulmão. Vale ressaltar que estes geralmente avaliam tecidos que podem ser coletados de forma menos invasiva que a biópsia do próprio órgão, por exemplo, amostras de sangue, células do nariz²³⁻²⁸.

Aarøe e colaboradores avaliaram o sangue de pacientes com câncer de mama e compararam com mulheres saudáveis usando a técnica de microarranjos. Os pesquisadores identificaram uma assinatura gênica em sangue que classifica, com um bom nível de acurácia, indivíduos com e sem câncer de mama. O teste produzido inclui sondas para avaliar a expressão de 738 genes. Nas pacientes com câncer de mama, observou-se a seguinte assinatura de expressão: 395 genes com níveis de expressão maior e 343 genes com menor concentração do RNA quando comparado a indivíduos sem a doença²³. Um teste diagnóstico para o câncer de mama baseado no transcriptoma de uma amostra de sangue (ao invés de biópsia do tecido mamário) é muito menos invasivo e pode ser usado como um sistema de triagem para minimizar os gastos nos sistemas de saúde.

Outro método *in vitro* baseado nas mudanças do transcriptoma sanguíneo para diagnosticar, identificar e monitorar casos de câncer de mama foi patenteado. O teste patenteado inclui a detecção de alterações na expressão de um conjunto de 345 genes ou de subconjuntos deles quando comparado a um padrão de expressão gênica extraído de sujeitos saudáveis. O conjunto gênico pode ser avaliado por métodos de análise transcriptômica que envolvem amplificação dos ácidos nucleicos (RT-PCR ou *qPCR arrays*) ou hibridização (microarranjos). Com o uso desse teste, casos de câncer de mama podem ser detectados antes que outros sinais e sintomas se tornem evidentes²⁴. Um teste de detecção precoce contribui para reduzir mortalidade e diminuir os custos aos sistemas de saúde, já que o transcriptoma revela a presença de um tumor antes que ele possa ser detectado por outros métodos (como a mamografia), e o tratamento pode ser iniciado antes que ele evolua e se torne invasivo.

Na busca pelo diagnóstico preciso de câncer colorretal e outras doenças relacionadas, Galamb e colaboradores²⁵ usaram microarranjos para desenvolver um perfil transcriptômico capaz de avaliar o material colhido durante biópsias e diferenciar entre câncer colorretal, síndrome do colo irritado, adenomas e pólipos hiperplásicos. No intuito de classificar as doenças colorretais em inflamatórias, benignas ou malignas, os autores propuseram o uso de um padrão de expressão de 18 genes, usando conhecimentos da biologia molecular no diagnóstico diferencial²⁵. Hauptman e colaboradores²⁶ usaram meios computacionais para reavaliar resultados de diversos estudos de expressão gênica na busca por um meio de diferenciar entre adenomas benignos e malignos. O padrão de expressão de um conjunto de 16 genes (COL12A1, COL1A2, COL3A1, DCN, PLAU, SPARC, SPON2, SPP1, SULF1, FADS1, GOS2, EPHA4, KIAA1324, L1TD1, PCKS1 e C11orf96) foi proposto pelos autores como método para distinguir entre os diferentes tipos de adenoma, com o intuito de melhor direcionar o tratamento dos pacientes²⁶.

O carcinoma hepatocelular tende a ser diagnosticado em estágios avançados da doença e geralmente tem um prognóstico ruim. Xie e colaboradores²⁷ desenharam um modelo de diagnóstico baseado em um padrão transcriptômico no sangue periférico que diferencia entre sujeitos saudáveis e pacientes com carcinoma hepatocelular em estágios iniciais. O padrão de expressão proposto, que avalia o RNA de nove genes (GPC3, HGF, ANXA1, FOS, SPAG9, HSPA1B, CXCR4, PFN1 e CALR), apresentou uma sensibilidade de 96% e especificidade de 86% para a detecção da doença em um estágio precoce.

Na busca por um método diagnóstico não invasivo para detectar câncer de pulmão, um grupo da Universidade de Boston desenvolveu um teste baseado no transcriptoma de células do nariz. O teste envolve a amostragem de células do epitélio nasal e a análise da expressão gênica de 535 genes ou de diferentes subconjuntos deles (com 20, 40, 60

ou 70 genes). O padrão de expressão desses genes, quando comparado ao transcriptoma de indivíduos sem a doença, revela se o indivíduo apresenta câncer no pulmão utilizando um procedimento de coleta pouco invasivo e uma metodologia de análise mais precisa que os outros testes disponíveis para o seu diagnóstico e prognóstico (raio-X do tórax, broncoscopia, análise citológica do escarro e tomografia)²⁸. No entanto, alguns desafios do ponto de vista técnico ainda persistem e serão expostos a seguir.

Desafios

Os estudos transcriptômicos produziram dados em abundância, mas, até agora, a comparação dos conjuntos gênicos gerados nos diferentes estudos tende a ser inconclusiva, como no caso de estudos com artrite reumatóide¹⁷. Um grande desafio na pesquisa transcriptônica é a reproduzibilidade dos resultados, o que dificulta a definição de um conjunto gênico padrão para a detecção de uma determinada doença.

Os mecanismos moleculares de transcrição (produzindo RNA) e a tradução (produzindo proteínas) são processos-chave na etiologia de doenças. O desenvolvimento de doenças é influenciado por diversos fatores ambientais e depende de interações altamente dinâmicas em diversas camadas: DNA, epigenética (modificações na cromatina e no DNA que alteram a expressão gênica), RNA, proteínas e metabólitos²⁹. Fatores que podem influenciar os resultados das análises incluem a fonte da amostra, metodologias experimentais e ferramentas analíticas¹⁷. De fato, o transcriptoma é bastante dinâmico, e pode ser alterado por fatores diversos. Diferenças no desenho experimental *in-vivo*, como o horário da coleta, o material biológico coletado, se o indivíduo se alimentou ou de está em jejum na hora da coleta, se o indivíduo se exercitou nas últimas 24h podem afetar o resultado das análises.

Há uma necessidade de harmonização dos estudos para que assinaturas de expressão

ligadas a determinadas doenças possam ser elucidadas, visando à produção de novos biomarcadores para uso na prática clínica¹⁷. O preparo dos indivíduos para a coleta de amostras deve ser padronizado no intuito de permitir a comparação entre os resultados de diversos estudos em meta-análises e o desenho de bons conjuntos de genes biomarcadores. A necessidade de padronização dos estudos transcriptômicos vai além da etapa *in-vivo* (com seres humanos), com as etapas de bancada e o processamento dos dados. Os estudos de RT-PCR e *qPCR arrays* compararam a expressão dos genes-alvo com genes-controle. A definição de genes-controle padrão para estudar determinadas doenças facilitaria na padronização e reprodutibilidade dos estudos. No caso de estudos por microarranjos e RNA-Seq, o tratamento dos dados deveria ser padronizado, já que algoritmos diferentes e limiares estatísticos distintos nesse processamento levam a diferentes conjuntos gênicos.

Os estudos transcriptômicos compararam indivíduos com a doença contra indivíduos saudáveis. Contudo, existe o ‘indivíduo saudável padrão’? Acreditamos que não. Como mencionado anteriormente, o transcriptoma é altamente dinâmico, e diversos fatores ambientais o influenciam. O padrão de expressão do grupo controle de um estudo pode diferir de outro por diversos aspectos, tanto genéticos quanto ambientais (que incluem modo de vida, alimentação, clima, poluição, estresse etc.). Uma solução para esse gargalo na pesquisa transcriptômica pode ser a comparação de duas amostras de um mesmo indivíduo antes e depois de uma determinada intervenção. Explicitando essa linha de pensamento, em um teste para avaliar o transcriptoma do diabetes, por exemplo, poderia ser colhida uma amostra de sangue em jejum, e após a ingestão de uma dose predeterminada de glicose, aguardar um tempo sob observação e colher outra amostra. A comparação do ‘depois’ *versus* ‘antes’ da ingestão da glicose revelará como o seu organismo reagiu à glicose. O metabolismo de indivíduos diabéticos ou pré-diabéticos reagirá

de forma diferente à dose de glicose quando comparado a indivíduo não diabético. Dessa forma, estariamos eliminando a necessidade de estabelecer um perfil genético para o ‘indivíduo saudável padrão’.

Regulamentação de métodos transcriptômicos de diagnóstico

No sistema de saúde da Inglaterra (National Health Service – NHS), o órgão responsável pelo aconselhamento e regulamentação da incorporação de tecnologias em saúde é o National Institute for Health and Care Excellence (Nice). Buscas nas diretrizes do Nice (www.nice.org.uk) com a expressão ‘gene expression’ e o termo ‘RNA’ revelaram oito testes transcriptômicos já regulamentados na Inglaterra, todos com o foco no câncer. Na avaliação transcriptônica do câncer de mama, foram encontrados alguns testes que avaliam a probabilidade de recorrência do câncer em um período de dez anos (EndoPredict, MammaPrint, Oncotype DX e Prosigna) e testes rápidos para avaliar se há metástase em amostras de linfonodos (RD-100i OSNA e Metasin). Na avaliação do câncer de próstata, o teste PROGENSA PCA3 avalia células da próstata em amostras de urina para o diagnóstico e o teste Prolaris avalia o perfil transcriptômico de amostras tumorais para predizer o risco de mortalidade em dez anos³⁰.

No Brasil, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologia no SUS (Conitec) assessorou o Ministério da Saúde na elaboração de protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas e na incorporação de tecnologias em saúde pelo SUS³¹. Uma busca nas diretrizes da Conitec (com os termos ‘expressão gênica’ e ‘RNA’) não revelou resultados relevantes no âmbito da transcriptômica diagnóstica.

Testes genômicos com base nas sequências de DNA já são regulamentados no Brasil para diagnosticar anomalias congênitas³².

A Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) emitiu a Nota Técnica 876/2013/GEAS/GGRAS/DIPRO/ANS com diretrizes de utilização de procedimentos de análise molecular de DNA com cerca de 30 testes genéticos que devem estar disponíveis aos usuários de planos de saúde³³. No entanto, as análises genômicas avaliam apenas a carga genética do indivíduo (o DNA). O Brasil, a exemplo da Inglaterra, deveria ir além dos testes de análise genômica e iniciar o processo de regulamentação das tecnologias transcriptômicas de diagnóstico.

Neste ensaio, partiu-se de premissa de descrever testes de diagnóstico molecular que estivessem incorporados e utilizados em sistemas de saúde semelhantes ao SUS, o que exclui os Estados Unidos da América. Portanto, não foram avaliados dados do Food and Drug Administration (FDA).

Considerações finais

A era pós-genômica trouxe novos desafios e oportunidades para a medicina diagnóstica. Na área da transcriptômica, pesquisas de bancada têm gerado assinaturas de expressão gênica ligadas a diversas doenças, havendo a necessidade de pesquisa translacional para a produção de testes diagnósticos, bem como para garantir a transferência da tecnologia e sua aplicação nos sistemas de saúde.

No futuro, testes diagnósticos avaliando múltiplos perfis de expressão gênica podem se transformar em exames de rotina em uma forma de triagem molecular, por exemplo, para diversos tipos de câncer. Um exame de sangue pode revelar se existe maior probabilidade de desenvolvimento de câncer em um determinado órgão, e exames mais específicos (e mais invasivos) seriam então realizados para confirmar o diagnóstico. A triagem molecular por métodos transcriptômicos pode contribuir para reduzir a mortalidade e economizar recursos para os sistemas de saúde pela capacidade de detecção precoce das doenças.

Colaboradores

Pacheco C (0000-0003-1829-1515)*, Ceccatto VM (0000-0003-4839-4400)* e Maia CM (0000-0002-7540-7177)* contribuíram para a concepção e planejamento do estudo; elaboração das primeiras versões; revisão crítica do conteúdo; aprovação da versão final do manuscrito. Rosa SSRF (0000-0002-1247-9050)* contribuiu para a responsabilização pelo conjunto da obra e aprovação da versão final. Leite CRM (0000-0003-1857-6238)* contribuiu para a responsabilização pelo conjunto da obra, redação do manuscrito e aprovação da versão final. ■

*Orcid (Open Researcher and Contributor ID).

Referências

1. Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA*. 2008; 299(2):211-213.
2. Marincola FM. Translational medicine: a two-way road [internet]. *J Transl Med*. 2003 [acesso em 2019 mar 10]; 1:1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202357/>.
3. Taylor N, Best S, Martyn M, et al. A transformative translational change programme to introduce genomics into healthcare: a complexity and implementation science study protocol [internet]. *BMJ Open*. 2019 [acesso em 2019 mar 10]; 9(3). Disponível em: <https://bmjopen.bmjjournals.org/content/9/3/e024681.abstract>.
4. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome [internet]. *Nature*. 2001 [acesso em 2019 mar 10]; 409:860-921. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35057062>.
5. Khoury MJ, Gwinn M, Ioannidis JPA. The Emergence of Translational Epidemiology: From Scientific Discovery to Population Health Impact [internet]. *American Journal of Epidemiology*. 2010 [acesso em 2019 mar 10]; 172:517-524. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927741/>.
6. Liu L, Li Z. Bridging the basic biomedical researches and clinical practices with biomedical informatics [internet]. *Journal of Translational Medicine*. 2012 [acesso em 2019 mar 10]; 10:A52. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3480033/>.
7. Krzyszczyk P, Acevedo A, Davidoff EJ, et al. The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment [internet]. *Technology*. 2018 [acesso em 2019 março. 10]; 6(3-4):79-100. Disponível em: <https://www.worldscientific.com/doi/10.1142/S2339547818300020>.
8. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [internet]. *Nature Methods*. 2008. [acesso em 2019 mar 10]; 5(7):621-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth.1226>.
9. Moreira CO, Ferraz ASM, Carvalho DP, et al., inventores; Universidade Estadual do Ceará, titular. Kit para análise de fenótipo de performance física, processo para determinação de fenótipo de performance física e uso do kit. Brasil n.PI 1020180058509, 2018 Mar 23.
10. Wieringa RJ. Design science methodology for information systems and software engineering. Berlin: Springer; 2014.
11. Pacheco C, Felipe SMDS, Soares MMDC, et al. A compendium of physical exercise-related human genes: an 'omic scale analysis [internet]. *Biol Sport*. 2018 [acesso em 2019 mar 10]; 35(1):3-11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6135974/>.
12. Mullis, KB, Faloona, FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction [internet]. *Methods Enzymol*. 1987 [acesso em 2019 mar 10]; 155:335-350. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3431465>.
13. Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complimentary DNA microarray. *Science*. 1995; 270:467-470.
14. Keller A, Stahler CF, Meese E, et al., inventores. Siemens Aktiengesellschaft, titular. Diagnostic miRNA markers for Alzheimer. World Patent WO 2014075911A1. 22 Maio 2014.
15. Youdim MBH, Mandel SA, Grunblatt E, et al., inventores. Technion Research and Development Foundation Ltd, titular. Diagnostic test for Parkinson's disease. United States Patent US 2010/0221735 A1. 2 Set 2010.

16. Barnes DA, Dempsey A, inventores. Metrigenix Corporation, Debra A. Barnes, Adam Dempsey, titulares. Markers for autoimmune disease detection. World Patent WO 2006020899A2. 23 Fev 2006. [acesso em 2019 mar 10];12(1):R7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078854>.
17. Burska AN, Roget K, Blits M, et al. Gene expression analysis in RA: towards personalized medicine [internet]. Pharmacogenomics J. 2014 [acesso em 2019 mar 10]; 14(2):93-106. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589910>.
18. Rosenberg S, Elashoff MR, Beineke P, et al. Multi-center Validation of the Diagnostic Accuracy of a Blood-Based Gene Expression Test for Assessing Obstructive Coronary Artery Disease in Nondiabetic Patients [internet]. Ann Intern Med. 2010 [acesso em 2019 mar 10]; 153(7):425-434. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921541>.
19. Liu Y, Morley M, Brandimarto J, et al. RNA-Seq Identifies Novel Myocardial Gene Expression Signatures of Heart Failure [internet]. Genomics. 2015 [acesso em 2019 mar 10]; 105(2):83-89. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25528681>.
20. Hu VW, inventor. The George Washington University, titular. Method and kit for diagnosing Autism using gene expression profiling. United States Patent US 20090117562A1. 7 Maio 2009.
21. Kunkel LM, Kohane IS, Kong SW, et al., inventores. Children's Medical Center Corporation, titular. Methods and compositions for characterizing autism spectrum disorder based on gene expression patterns. World Patent WO 2013066972A1. 10 Maio 2013.
22. Kunthara S, Ho C. CardioDx, maker of heart disease test, shutting down as Medicare rescinds coverage [internet]. San Francisco Chronicle. 2019. [acesso em 2019 jan 9]. Disponível em: <https://www.sfcronicle.com/business/article/CardioDx-maker-of-heart-disease-test-shutting-13518778.php>.
23. Aarøe J, Lindahl T, Dumeaux V, et al. Gene expression profiling of peripheral blood cells for early detection of breast cancer [internet]. Breast Cancer Res. 2010 [acesso em 2019 mar 10];12(1):R7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078854>.
24. Dumeaux V, Lund E, inventores. University of Tromsøe, titular. Gene expression profiles in diagnostics. World Patent WO 2014081313A1. 30 Maio 2014.
25. Galamb O, Sipos F, Solymosi N, et al. Diagnostic mRNA Expression Patterns of Inflamed, Benign, and Malignant Colorectal Biopsy Specimen and their Correlation with Peripheral Blood Results [internet]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 [acesso em 2019 mar 10]; 17(10):2835-45. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843029>.
26. Hauptman N, Boštjančič E, Žlajpah M, et al. Bioinformatics Analysis Reveals Most Prominent Gene Candidates to Distinguish Colorectal Adenoma from Adenocarcinoma [internet]. Biomed Res Int. 2018. [acesso em 2019 mar 10]. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/9416515/>.
27. Xie H, Xue YQ, Liu P, et al. Multi-parameter gene expression profiling of peripheral blood for early detection of hepatocellular carcinoma [internet]. World J Gastroenterol. 2018 [acesso em 2019 mar 10]; 24(3):371-378. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5776398/>.
28. Brody JS, Spira A, Berman J, et al., inventores. The Trustees of Boston University, titular. Diagnostic and prognostic methods for lung disorders using gene expression profiles from nose epithelial cells. World Patent WO 2007103541A2. 8 Mar 2007.
29. Sun YV, Hu YJ. Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases [internet]. Adv Genet. 2016 [acesso em 2019 mar 10]; 93:147-190. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26915271>.
30. National Institute for Health and Care Excellence (NICE) [internet]. 2019 [acesso em 2019 mar 10]. Disponível em: <https://www.nice.org.uk/>.
31. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias

- no SUS (CONITEC) [internet]. 2019. [acesso em 2019 mar 10]. Disponível em: <http://conitec.gov.br/>.
32. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC): Recomendações sobre as tecnologias avaliadas. 2014. [acesso em 2019 mar 10]. Disponível em: <http://conitec.gov.br/decisoes-sobre-a-incorporacao-de-tecnologias-no-sus-2014>.
33. Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). Nota Técnica 876/2013/GEAS/GGRAS/DIPRO/ANS. Rio de Janeiro: Agência Nacional de Saúde Suplementar; 2013.

Recebido em 16/04/2019

Aprovado em 10/09/2019

Conflito de interesses: inexistente

Suporte financeiro: o projeto contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)