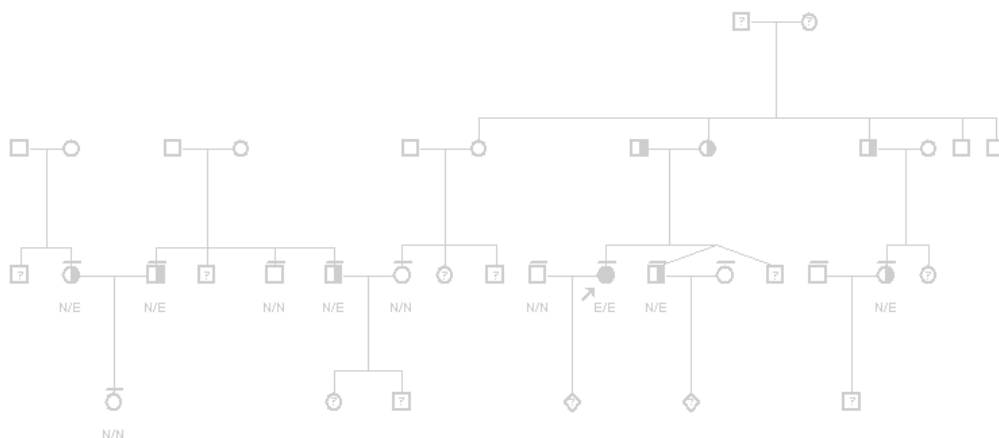




“Frequência de portadores para a Ataxia de
Friedreich em Portugal: considerações éticas e legais
sobre o papel da medicina preditiva na prevenção de
doenças genéticas”

Dissertação de Mestrado da Licenciada

Joana Isabel Cruz Santos Rodrigues Cerqueira

Porto, 2006



Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Mestrado em Ciências Forenses

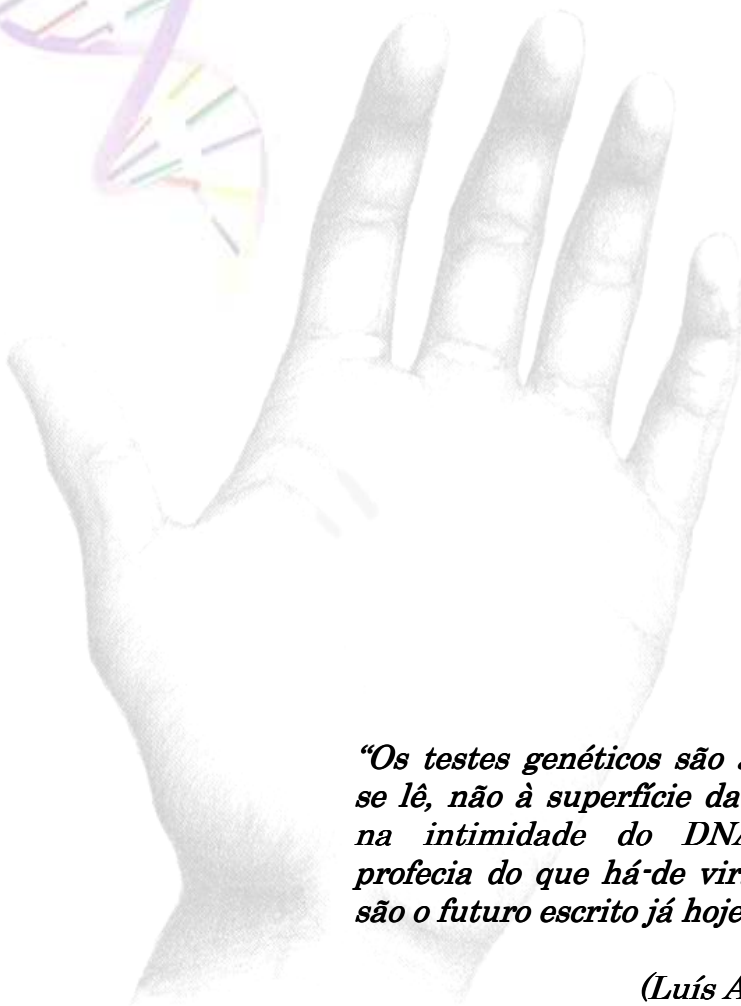
“Frequência de portadores para a Ataxia de Friedreich em Portugal: considerações éticas e legais sobre o papel da medicina preditiva na prevenção de doenças genéticas”

Orientação: Professor Doutor Jorge Sequeiros

Joana Isabel Cruz Santos Rodrigues Cerqueira

Porto, 2006

Dissertação de candidatura ao
grau de Mestre apresentada à
Universidade do Porto



“Os testes genéticos são a sina que se lê, não à superfície da mão, mas na intimidade do DNA. São a profecia do que há-de vir. Os genes são o futuro escrito já hoje”

(Luís Archer)

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Jorge Sequeiros, meu orientador e meu chefe, que muito contribuiu para a realização desta tese. Por toda a disponibilidade e incentivo e pelo tanto que me tem ensinado na área da ética e da genética médica. Agradeço também, o enorme empurrão, fundamental para começar a escrever esta dissertação. Esteve presente quando mais precisei.

À Prof. Doutora Teresa Magalhães pela motivação na realização deste Mestrado e todo o entusiasmo que sempre incutiu aos alunos durante todo o curso.

À Prof. Doutora Maximina Pinto e Prof. Doutora Laura Vilarinho, do Instituto de Genética Médica, pela cortesia no fornecimento das amostras.

Ao Carlos Miranda por todo o apoio nos momentos de maiores dúvidas.

À equipa do CGPP que esteve sempre presente durante este percurso e que com algumas cedências me ajudou nesta caminhada. À Paula, à Susana, e um agradecimento especial ao Eduardo pela colaboração nos momentos de maior aflição.

À Natália e à Cláudia pelo incentivo que sempre me deram e pela tranquilidade que me tentaram transmitir para conseguir a concentração necessária.

Aos meus pais e aos meus avós por todo o incentivo e força que sempre me transmitiram, não só durante este período, como durante toda a minha vida. Agradeço especialmente terem-me aturado nas alturas mais difíceis.

Ao Paulo, pela força, por ouvir os meus desabafos e partilhar comigo todos estes instantes, mesmo os de maior ansiedade.

Acrónimos

ASHG	<i>American Society of Human Genetics</i>
ATP	adenosina tri-fosfato
CGPP	Centro de Genética Preditiva e Preventiva
CNPd	Comissão Nacional de Protecção de Dados
CVS	vilosidades coriónicas
DNA	ácido desoxirribonucleico
ESHG	<i>European Society of Human Genetics</i>
Exp	alelos expandidos
F	sexo feminino
FARR	<i>FRDA with retained reflexes</i>
<i>FXN</i>	gene da frataxina
Fe-S	complexos ferro-enzofre
FRDA	ataxia de Friedreich
IBMC	Instituto de Biologia Molecular e Celular
i.i.	idade de início
IGM	Instituto de Genética Médica
LN	<i>long normal alleles</i> (alelos normais de elevado tamanho)
LOFA	<i>late onset Friedreich ataxia</i>

M	sexo masculino
NBAC	<i>National Bioethics Advisory Commission</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTM	Organização Tutelar de Menores
³²P	fósforo radioactivo
pb	<i>pares de bases</i>
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
PM	pré-mutações
RNA	ácido ribonucleico
SN	<i>small normal alleles</i> (alelos normais de pequeno tamanho)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SNS	Serviço Nacional de Saúde
SOD	superóxido dismutase
STR	<i>short tandem repeat</i>
VLOFA	<i>very late onset Friedreich ataxia</i>

Índice

Agradecimentos	V
Acrónimos	VII
Índice	IX
Resumo	XV
Abstract	XVII
1.Introdução	1
1.1. A ataxia de Friedreich	3
Diagnóstico clínico da FRDA	6
Genética Molecular	7
Heterogeneidade genética	10
Instabilidade do <i>repeat</i> GAA	11
Origem da mutação	12
A frataxina	14
Correlação genótipo/fenótipo	18
Tratamento da FRDA	20
Tratamento das manifestações clínicas	22
Risco de transmissão	22

1.2. Medicina preditiva	25
Testes pré-sintomáticos e de portador	27
Aconselhamento genético	29
Consentimento informado	30
Acesso de menores à realização de testes pré-sintomáticos ou de portador	33
Confidencialidade e protecção de dados genéticos	36
1.3. Bancos de produtos biológicos	39
Biobancos na Europa	41
Armazenamento de amostras	43
Consentimento informado para a colheita e armazenamento de amostras biológicas	47
Cartões <i>Guthrie</i>	50
1.4. Rastreios genéticos	56
1.5. A ataxia de Friedreich em Portugal	60
2. Razão do Estudo	67
2.1. Casos clínicos	69
3. Objectivos	73
3.1. Frequência de portadores para a FRDA	75
3.2. Discussão ético-legal sobre a utilização de biobancos de <i>Guthries</i>	75
3.3. Discussão do enquadramento forense da medicina preditiva	76

4. Material e Métodos	77
4.1. Amostra	79
Requisitos da amostra	79
Quantidade de amostras biológicas	80
4.2. Extracção de DNA	83
4.3. Quantificação de DNA	84
4.4. Preparação das amostras	84
4.5. Amplificação do gene da FRDA (<i>FXN</i>) por PCR	85
Amplificação dos alelos de tamanho normal	85
Amplificação dos alelos expandidos (<i>long range PCR</i>)	86
4.6. Detecção dos produtos da amplificação em gel de agarose	87
Alelos normais	87
Alelos expandidos	89
4.7. Estratégia de amplificação	91
4.8. <i>Southern Blotting</i>	91
Transferência do DNA para membrana de <i>nylon</i>	91
Marcação da sonda com fósforo radioactivo (^{32}P)	92
Hibridação da membrana com ^{32}P	92
Autorradiografia	93

5. Resultados	95
5.1. Detecção dos produtos de amplificação em gel de agarose	97
Gel de agarose a 2% (alelos normais)	97
Gel de agarose a 1% (alelos expandidos)	98
<i>Southern blotting</i>	100
5.2. Avaliação da distribuição alélica na população estudada	101
Distribuição alélica na população total	102
Tipos de alelos encontrados em cada distrito	103
Variação dos diferentes tipos de alelos com o sexo	104
Variação dos diferentes tipos de alelos com o sexo nos distritos estudados	105
Alelos expandidos encontrados	107
Distribuição geográfica dos alelos patogénicos e pré-mutações	109
Alelos normais encontrados	110
Homozigotia/heterozigotia nos alelos normais	111
5.3. Frequência de portadores para a FRDA	112
6. Discussão	113
6.1. A mutação da FRDA na população portuguesa (resultados experimentais)	115
Alelos encontrados	116
Variação dos alelos com o sexo	118

Distribuição geográfica	119
Detecção de heterozigotos normais	120
Frequência calculada	121
6.2. Utilização forense da genética humana	123
Utilização da informação genética codificante	126
Utilização da medicina preditiva	127
Utilização da genética médica	128
6.3. Medicina preditiva	129
O direito de conhecer ou não os resultados	132
O dever de informar os familiares	134
6.4. Discriminação face ao património genético	137
No casamento	138
Na adopção, na perfilhação e na regulação do poder paternal	141
Pela entidade empregadora	145
Pelas companhias de seguros	148
Nos empréstimos bancários	152
Na atribuição de prestações sociais	153
6.5. Possibilidade de um rastreio genético de portadores para a ataxia de Frederico	155
Rastreio neonatal na FRDA?	157
Rastreio pré-concepcional na FRDA?	159

Rastreio em cascata na FRDA?	161
6.6. Utilização de um biobanco de <i>Guthries</i>	162
Constituição do biobanco	164
“Bancos de DNA e outros produtos biológicos”	165
A importância de um consentimento	167
6.7. Utilização de <i>Guthries</i> na resolução de casos forenses	168
Suspeita de crime	169
Casos de filiação biológica	171
Consentimento para esta utilização	173
6.8. Contributo médico-legal desta dissertação	174
7. Conclusões	177
8. Referências	183
8.1 Bibliografia adicional	198
9. Apresentação de trabalho	201

Resumo

A ataxia de Friedreich (FRDA) é uma doença neurodegenerativa autossómica recessiva, com uma prevalência estimada em populações caucasianas entre 2 e 4 :100.000, e uma frequência de portadores (heterozigotos) de 1:60 a 1:100. Duas famílias seguidas em aconselhamento genético levaram à descoberta de vários portadores inesperados (na população geral). Foi, assim, levantada a possibilidade da frequência da mutação causadora da FRDA poder estar aumentada na população portuguesa.

Para testar essa hipótese, foi realizado um estudo populacional a partir de 1059 (529F, 530M) amostras anónimas de sangue seco em papel (cartões *Guthrie*), resultantes do rastreio neonatal da fenilcetonúria e hipotiroidismo congénito, que cobre cerca de 99% da população portuguesa.

A população testada apresentava uma distribuição de acordo com a densidade populacional de cada um dos 20 distritos.

A frequência de portadores foi calculada em 1:106, o que está de acordo com o descrito na literatura para outras populações europeias. A prevalência da doença foi estimada em 2:100.000 (ou aproximadamente 1:45.000) e o número de doentes esperado em Portugal, em cerca de 220 (um terço dos quais já confirmados molecularmente).

Verificou-se que, no caso específico da FRDA, apenas o rastreio em cascata, realizado às famílias afectadas no âmbito

de aconselhamento genético deve ser aplicado, como forma de prevenir a transmissão desta doença, não se justificando, pois, um rastreio de base populacional. A comunicação dos resultados a familiares que até aí desconheciam a possibilidade de serem portadores, levanta no entanto, questões éticas e legais de difícil resposta.

São ainda discutidas outras questões ético-legais, colocadas pela possível discriminação em face dos resultados de testes genéticos, devido ao interesse potencial destes, como preliminar de certos negócios jurídicos (casamento, adopção, emprego e aquisição de seguros, entre outros).

Outras questões relevantes discutidas ao longo deste trabalho, são a possibilidade de utilização futura em investigação científica do material biológico usado neste estudo, bem como a necessidade de consentimento informado para a colheita de amostras e criação de um biobanco de cartões *Guthrie*.

Discute-se ainda a possibilidade da utilização da medicina preditiva e do DNA codificante num contexto forense, assim como a utilização do biobanco de *Guthries* em estudos epidemiológicos, em investigação fundamental, em aconselhamento genético, e na resolução de casos criminais e com fins identificativos.

A discussão e colaboração activa entre equipas multidisciplinares das áreas forense e da genética médica será fundamental para ajudar a elucidar estas questões.

Abstract

Friedreich ataxia (FRDA) is a neurodegenerative disorder, inherited as an autosomal recessive, with an estimated prevalence of 2-4:100,000 and a carrier frequency of 1:60 to 1:100, in most European populations. An affected family followed in genetic counselling and cascade testing, led to the finding of 3 unexpected mutation carriers from the general population (spouses).

We performed a populational study, using 1059 (529F, 530M) anonymous blood spots in Guthrie cards, distributed by the 20 districts of Portugal, according to their populational density.

The carrier frequency obtained in this work was 1:106, which is in agreement with the values mentioned in the literature for other European populations.

Disease prevalence was estimated at 2:100.000 (approximately 1:45.000); thus, the number of patients expected in Portugal would be 220. About one third of these have already been molecularly confirmed at our laboratory.

We concluded that family (cascade) screening in the context of genetic counselling is the right option to prevent the transmission of this disease, and that there is no justification for a population screening programme.

Ethical and legal aspects of genetic testing (in predictive medicine) are discussed, including possible discrimination in the society, as in insurance, employment, education and adoption.

We discuss other possible (mis)uses of biological samples, as those used in this study, and the need of informed consent for its collection and storage (biobanking). We discuss also the usefulness of predictive medicine and Guthrie samples in the resolution of forensic cases.

Many questions are still unanswered, and in need of a multidisciplinary discussion between medical genetics and forensic specialists.

1. Introdução

1. Introdução

1.1. *A ataxia de Friedreich*

A ataxia de Friedreich (FRDA) é uma doença neurodegenerativa autossómica recessiva caracterizada por sintomas cardíacos, musculares e metabólicos.

A FRDA é uma ataxia lentamente progressiva, com início geralmente antes dos 25 anos. Cerca de 25% dos doentes apresentam um início atípico, mais tardio.

Os sintomas da FRDA são ataxia progressiva, disartria, diminuição de reflexos nas pernas, e da sensibilidade vibratória. Outros sintomas menos comuns, que surgem no decurso da doença, são a cardiomiopatia (dois terços dos doentes), a diabetes (em 10% dos indivíduos afectados), escoliose, atrofia óptica (25% dos casos) e perda de audição (cerca de 10% dos doentes). Estes últimos sintomas surgem em doentes com um maior número de repetições GAA. Muito raramente, aparecem doentes FRDA com atraso mental, distonia ou coreia, idade de início inferior aos 4 anos de idade e presença de atrofia cerebelosa observada com imagiologia cerebral. Normalmente, exames de RMN revelam um cerebelo normal, mas uma espinal medula cervical atrofiada (Bidichandani et al, 2006).

A morte, normalmente, ocorre na década dos trinta. Apesar disto, já foram documentados casos de sobrevivência até aos sessenta ou setenta anos.

Os sintomas relacionados com a cardiomiopatia ocorrem normalmente nos estadios mais tardios da doença, mas em casos raros podem anteceder a ataxia (Bidichandani et al, 2006).

A cardiomiopatia e a diabetes são, geralmente, as causas de morte, mas também uma pneumonia provocada pela disfagia, pode encurtar o tempo de vida.

Ao contrário do que seria de esperar numa doença recessiva, a FRDA apresenta uma gama alargada de manifestações clínicas. Cerca de 25% dos doentes com mutações identificáveis no gene da FRDA apresentam sintomatologia atípica. Entre estes casos, podem ser citados os de início tardio (LOFA - *late onset FRDA*), em que a doença aparece entre os 26 e os 39 anos, ou de início muito tardio (VLOFA - *very late onset FRDA*), começando a desenvolver-se depois dos 40 anos. O limite superior, até ao momento, da idade de início da sintomatologia em indivíduos homozigóticos para a expansão GAA é aos 51 anos. A progressão da doença é geralmente mais lenta na LOFA e VLOFA, que em doentes com FRDA típica, incluindo uma necessidade mais tardia de cadeira de rodas.

Outro grupo de doentes, designado por FARR (*FRDA with retained reflexes*), representa cerca de 12% dos casos. Os reflexos osteo-tendinosos podem estar conservados até mais de 10 anos após o aparecimento da doença. Nestes indivíduos,

verifica-se um início mais tardio e uma incidência menor de alterações esqueléticas e de cardiomiopatia.

Um grupo mais raro de doentes apresenta paraparésia espástica, em vez de ataxia. Esta manifestação clínica é mais frequente em indivíduos com alelos expandidos de menor tamanho ou nos heterozigotos compostos para a mutação pontual G130V (Bidichandani et al, 2006).

A prevalência da ataxia de Friedreich está descrita como sendo de 1 em cada 50,000 (Cossé et al, 1997). Bidichandani et al (2006) apresentam uma prevalência de 2-4:100.000. É a ataxia hereditária mais comum na Europa, na Índia (ainda que com baixa prevalência) (Mukerji et al, 2000), no Médio Oriente e Norte de África. A FRDA não está documentada na Ásia oriental, na África sub-sahariana nem nos nativos norte-americanos (Labuda et al, 2000). A frequência de portadores está estimada em 1:60 a 1:100 para populações caucasianas (Bidichandani et al, 2006; Brice, 2004; Palau et al, 2006).

Esta doença foi identificada por Nicholas Friedreich, Professor da Faculdade de Medicina de Heidelberg, na Alemanha, há cerca de 120 anos (Morgan, 1997). Desde então, laboratórios por todo o mundo têm procurado descobrir o mecanismo patogénico desta doença, tendo chegado à frataxina, uma proteína mitocondrial.

Diagnóstico clínico da FRDA

O diagnóstico clínico da ataxia de Friedreich foi estabelecido em 1976 por Geoffroy et al e mais tarde completado por Harding (1981). Foram estabelecidos como critérios obrigatórios (Bidichandani et al, 2006):

1. Ataxia progressiva da marcha e dos membros,
2. Ausência de reflexos nas pernas,
3. Idade de início antes dos 25 anos,
4. Disartria, decréscimo da sensibilidade posicional e vibratória dos membros inferiores e fraqueza muscular,
5. Hereditariedade autossômica recessiva.

Outros sinais frequentes são:

- a escoliose,
- *pes cavus*,
- cardiomiopatia hipertrófica do tipo não obstrutivo,
- atrofia óptica,
- surdez,
- intolerância à glucose (20 %) e diabetes (10 %).

Genética molecular

O gene envolvido na FRDA (*FXN*) anteriormente denominado gene X25, é o único directamente implicado na patogénese da ataxia de Friedreich e encontra-se localizado no cromossoma 9, mais precisamente na região 9q13 (Bidichandani et al, 2006).

Cromossoma 9

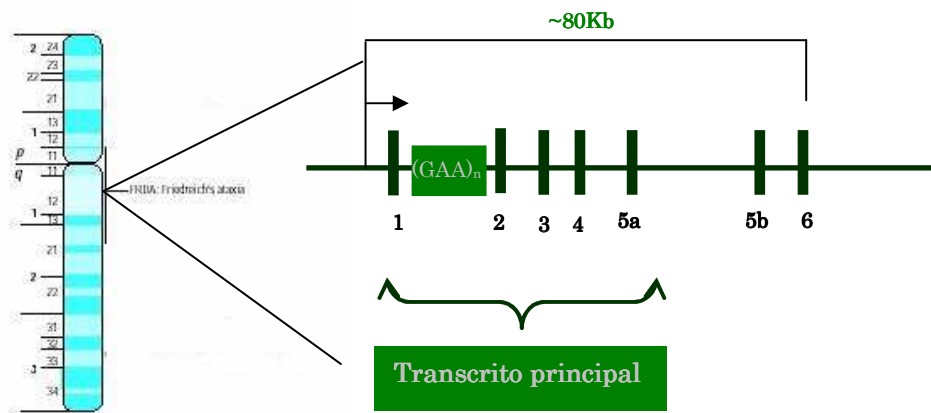


Fig.1. Gene da frataxina (*FXN*), localizado em 9q13

A FRDA é causada por uma expansão de um triplete GAA repetitivo no intrão 1 do gene da frataxina, representando um polimorfismo de tamanho (Campuzano et al, 1996; Cossé et al, 1997; Montermini, 1997).

Este gene é constituído por sete exões, seis dos quais codificam para uma das duas grelhas de leitura (Campuzano et al, 1996). Os primeiros cinco exões (1 a 5a) dão origem ao

principal transcripto, que codifica a proteína frataxina, com 210 aminoácidos.

Cerca de 96% dos indivíduos afectados são homozigóticos para a expansão GAA. Estes doentes têm dois genes da frataxina anormais, geralmente com expansões entre 66 e 1700 tripletos repetidos. As expansões mais frequentes apresentam um número de repetições entre 600 e 1200 (Campuzano et al, 1996; Filla et al, 1996; Durr et al, 1996; Epplen et al, 1997). Estes alelos têm penetrância completa, ou seja, são sempre causadores de sintomatologia.

Cerca de 4% dos doentes FRDA apresentam expansão em apenas um gene de um dos cromossomas homólogos, enquanto no outro alelo têm uma mutação pontual inactivante, alguns no gene da frataxina (heterozigotos compostos).

Fenotipicamente, não aparentam ser diferentes dos doentes com duas expansões nos dois cromossomas homólogos. Ainda não foram encontrados doentes com duas mutações pontuais em ambos os alelos do gene da frataxina.

A maioria dos indivíduos normais (mais de 80%) têm alelos com menos de 12 *repeats*. Aproximadamente 15% dos indivíduos normais, têm alelos com 12 a 33 repetições; contudo muito poucos têm alelos com mais de 27 *repeats* GAA. Existem alelos considerados pré-mutações. Embora não estejam ainda associados a doença, podem sofrer hiperexpansão durante a transmissão parental, resultando em alelos patogénicos (Cossé et al, 1997; Epplen et al, 1997, Montermini et al, 1997). As pré-mutações contêm entre 34 e 65

repetições do triplete GAA não interrompidas. A hiperexpansão pode ocorrer quer na transmissão materna, quer paterna (Pianese et al, 1997). Estes alelos são raros, representando menos de 1% dos alelos não associados à doença (Montermini et al, 1997).

Foi postulado que a interrupção destes alelos com mais de 27 *repeats* por sequências do tipo (GAGGAA)_n e (GAAAGAA)_n pode estabilizar as pré-mutações evitando a sua expansão para alelos mutados (Montermini et al, 1997; Cossé et al, 1997). Contudo, o significado clínico destas interrupções ainda não foi completamente estabelecido. O tamanho do alelo patogénico mais pequeno também não está ainda perfeitamente definido, sendo possível que haja penetrância incompleta associada às expansões com menos de 100 repetições.

Nos 4 % dos heterozigotos compostos (com uma expansão GAA num dos alelos e uma mutação pontual no outro alelo), todas as mutações provocam perda de função da proteína, o que é consistente com o padrão de hereditariedade autossómica recessiva.

As mutações inactivadoras do gene da frataxina, que não as expansões de tripletos repetidos, podem ser de três tipos:

- mutações *missense*, nas quais há substituição de uma base com alteração do aminoácido correspondente a esse codão;
- mutações *nonsense* (um codão *stop* aparece no meio do gene), que resultam na terminação prematura da tradução, originando uma proteína truncada;

- erros de *splicing* ou mutações *frameshift*, as quais alteram o quadro de leitura por adição ou deleção de uma ou duas bases, o que resulta na produção de uma proteína com a sequência alterada;

Os codões 1, 106, 165 e 182 são *hot-spots* mutacionais, ou seja, locais onde estas mutações ocorrem mais frequentemente.

Heterogeneidade genética

Em alguns estudos é possível encontrar indivíduos com típica sintomatologia de FRDA, mas sem nenhuma expansão GAA, bem como indivíduos portadores da mutação com variantes fenotípicas da FRDA (McCabe et al, 2000). Menos de 1% dos indivíduos que satisfazem o diagnóstico clínico da FRDA, não apresentam expansão GAA no gene da frataxina. Será, assim, possível que estes doentes apresentem mutações num *locus* diferente do gene da FRDA (McCabe et al, 2000; Christodoulou et al, 2001; Kimura et al, 2002). É também possível que estes doentes tenham duas mutações pontuais, não detectadas, no gene da frataxina ou então apresentem um outro síndrome atáxico que mimetize o fenótipo da FRDA.

A heterogeneidade de *locus* na FRDA tem sido investigada por análise de ligação, tendo-se descoberto um novo *locus*, designado por *FRDA2* (Christodoulou et al, 2001).

Instabilidade do *repeat* GAA

É muito difícil a distinção entre pré-mutações e alelos expandidos de pequeno tamanho. A interpretação destes alelos é complicada pela possibilidade da ocorrência de mosaicismos podendo o tamanho da expansão GAA nos leucócitos (onde se mede habitualmente) ser diferente da detectada em tecidos relevantes para a patologia, como a medula espinal e o coração (Hellenbroich et al, 2001). Os alelos expandidos podem também apresentar variabilidade de tamanho (mosaicismos) nas diferentes células do mesmo tecido (Campuzano et al, 1996; Sharma et al, 2002; Machkhas et al, 1998; Bidichandini et al, 1999; Montermini et al, 1997 ; Pianese et al, 1997) .

Embora a repetição do triplete GAA seja relativamente estável nos alelos normais, torna-se bastante instável durante a transmissão parental dos alelos expandidos (Pianese et al, 1997 ; De Michelle et al, 1998). Num estudo realizado em 1997, foi demonstrada instabilidade da expansão GAA em cerca de 85% dos casos estudados, o que é comparável com o observado para outros tipos de repetições de tripletos, embora na FRDA se verifique sobretudo uma tendência para contracção, ao contrário de algumas outras mutações dinâmicas que tendem a ganhar unidades repetidas durante a transmissão parental (Pianese et al, 1997).

Verifica-se um efeito diferencial na instabilidade do *repeat*, consoante a transmissão é materna ou paterna. Enquanto na

transmissão materna se verificam expansões e contracções, as transmissões paternas resultam sobretudo na contracção do número de tripletos repetidos. O número de repetições do trinucleotídeo GAA é geralmente menor nas crianças afectadas, do que nos seus pais que são portadores do gene alterado (Pianese et al, 1997). O tamanho das expansões GAA no esperma é quase sempre inferior ao encontrado no sangue (Pianese et al, 1997; De Michelle et al, 1998), podendo representar uma explicação biológica para as contracções observadas na transmissão paterna.

A amplitude da variação do tamanho da repetição é tipicamente de 10 a 20 % do tamanho inicial do alelo. Apesar de em alguns casos se verificar uma variação inter-geracional das expansões que excede os 50%, nunca se observou uma reversão completa com contracção para o tamanho normal do gene *FXN*.

Origem da mutação

Estudos genéticos sobre a origem da principal mutação causadora da ataxia de Friedreich (expansão do trinucleotídeo GAA), revelaram que mais de 95% dos doentes com origem caucasiana (incluindo países europeus e árabes), receberam a mutação de um ancestral comum que viveu há muitos milénios atrás (desde a população do paleolítico). Este não passou uma expansão à descendência mas sim um alelo com cerca de 18 repetições GAA, sendo o mais comum na altura o

de 9 GAAs (Cossé et al, 1997; Labuda et al, 2000). O alelo maior, mais instável, deu origem às expansões de tripletos repetidos GAA causadoras da doença por sucessivas expansões ao longo dos milénios. Por análise de haplótipos, foi demonstrado que a maioria dos alelos normais de elevado tamanho e as expansões partilham o mesmo haplótipo principal, o qual quase não foi observado nos alelos normais de pequeno tamanho. Esta observação indica que a maioria dos alelos normais longos (se não todos) tiveram origem num cromossoma inicial e todas as expansões derivaram destes, possivelmente por intermédio de pré-mutações (Cossé et al, 1997; Labuda et al, 2000).

Foi proposto um mecanismo de dois passos para a origem das expansões. Segundo esta hipótese os alelos normais longos, tiveram origem na duplicação de um alelo normal de pequeno tamanho, passando de 9 para 18 GAAs (Labuda et al, 2000). Posteriormente, as pré-mutações, com a sua propensão para a hiperexpansão, teriam tido origem numa segunda duplicação envolvendo estes alelos normais de longo tamanho. Estudos de *linkage* e de haplótipos indicam que a transição dos alelos normais longos para pré-mutações e alelos expandidos ocorreu há cerca de 25000 anos (Labuda et al, 2000), ou seja, cerca de 682 gerações atrás.

A frataxina

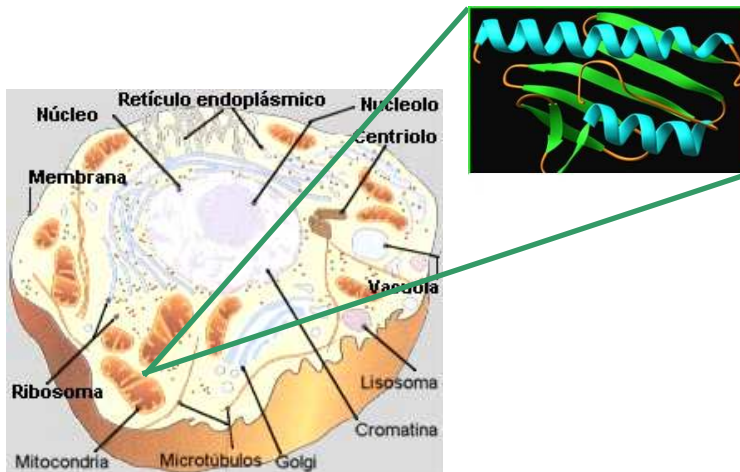


Fig.2. A frataxina humana desempenha um importante papel na mitocôndria.

Passado cerca de um ano após a descoberta do gene da FRDA começaram a surgir novas luzes no mecanismo envolvido nesta doença.

A proteína codificada por este gene causador da doença, a frataxina, está localizada na membrana interna das mitocôndrias (Campuzano et al, 1997), as quais são responsáveis pela respiração celular com produção de adenosina tri-fosfato (ATP), que suporta as necessidades energéticas da célula.

A patologia na FRDA resulta de uma deficiência na frataxina ou na perda da sua função, o que resulta numa acumulação de ferro na mitocôndria (Morgan, 1997). Esta proteína desempenha um papel importante na regulação do conteúdo mitocondrial de ferro, mediando a sua saída deste organelo. A deficiência

em frataxina diminui a defesa antioxidante com dano oxidativo aumentado.

Sequências com mais de 59 repetições GAA formam uma nova estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA), que foi designado por “sticky DNA”, a qual é formada por associações intermoleculares (Vetcher et al, 2002). Esta estrutura do DNA interfere com a transcrição do ácido ribonucleico (RNA) (Bidichandani, 2006).

Foram feitos estudos em levedura (Babcock, 1997), que também demonstrou ter frataxina com função e localização similares. Nestes estudos, o gene da levedura foi inativado, mimetizando a situação dos doentes FRDA. Ao contrário dos humanos, as leveduras conseguem sobreviver sem mitocôndrias quando crescem em certos meios. Mas, se estes mutantes de levedura forem forçados a usar a mitocôndria, ficam gravemente alterados, falhando na produção de energia. Estes mutantes tornam-se particularmente sensíveis aos compostos oxidantes que se libertam durante a respiração oxidativa que ocorre para a produção de energia (Babcock, 1997). Neste estudo foi também detectada uma acumulação de ferro, cerca de 10 vezes superior, nas suas mitocôndrias.

O ferro é um bom agente catalítico na produção de espécies reactivas de oxigénio a partir dos compostos oxidativos usados na respiração mitocondrial, e daí a elevada sensibilidade da célula à acumulação deste componente.

A frataxina desempenha um papel na regulação do conteúdo mitocondrial de ferro, provavelmente mediando a saída do

metal. A acumulação de ferro causa disfunção mitocondrial, catalisando a produção de radicais livres, ajudando quimicamente à formação de moléculas instáveis que vão destruir nervos e órgãos (Morgan , 1997).

Os órgãos afectados na FRDA, incluindo o coração, são muito ricos em mitocôndrias. Estudos em modelos animais demonstram que a frataxina é mais expressa nestes tecidos do que em quaisquer outros. Também muito ricos em frataxina são o fígado, o pâncreas, o estômago e o tecido adiposo castanho encontrado nos recém-nascidos. No entanto, com excepção do pâncreas, os outros órgãos não aparecem afectados na ataxia de Friedreich. Estes estudos foram feitos no ratinho, pelo que a transposição dos resultados do modelo animal para o que se passa no humano não é assim tão linear. Os tecidos primeiramente afectados na FRDA são os que normalmente expressam elevados níveis de frataxina. Os níveis de frataxina nas células sanguíneas, no músculo, na medula espinhal e no cérebro estão muito diminuídos nos doentes com FRDA, em comparação com os indivíduos normais (Morgan, 1997).

Uma relação mais evidente da FRDA com a acumulação de ferro ficou demonstrada em estudos *post-mortem* feitos por Lamarche et al em 1993, que encontrou níveis de ferro acima dos valores normais no coração dos pacientes estudados.

A maioria das células humanas desenvolveram mecanismos sofisticados de combate aos radicais livres, mesmo na ausência de frataxina. Daí que a acumulação de ferro não seja

tão dramática nas células destes doentes e a progressão da doença seja lenta.

A frataxina humana parece desempenhar um papel importante na biogénese de complexos ferro-enzofre (Fe-S) e, consequentemente, na síntese de enzimas constituídas por estes complexos, como as que estão envolvidas na cadeia respiratória e as aconitases (Rotig et al, 1997). Biópsias de endocárdio de indivíduos com FRDA demonstram uma deficiência nestas proteínas (Bidichandini et al, 2006).

Estudos mais recentes reforçam a ideia de que a acumulação de ferro parece ser um efeito secundário da deficiente biogénese das enzimas respiratórias com complexos Fe-S e/ou uma função mitocondrial deficiente (Puccio, 2001).

Ratinhos *knock-out* completamente deficientes em frataxina, morrem durante a embriogénese, indicando que a frataxina é essencial para o desenvolvimento embrionário inicial (Cossé et al, 2000). Esta pode ser a razão que justifica o facto de ainda não se ter encontrado até à data humanos com ambos os alelos inactivados (como nas mutações pontuais conhecidas). Na verdade, mesmo os indivíduos homozigotos para expansões de elevado tamanho apresentam uma expressão residual de frataxina.

Em resumo, a diminuição da frataxina leva a uma defesa antioxidativa reduzida, a uma função mitocondrial deficiente e a um dano oxidativo aumentado. Fibroblastos de indivíduos com FRDA têm maior dificuldade na indução da enzima superóxido dismutase (SOD), que responde ao *stress*

oxidativo. Apresentam também um baixo valor de enzimas antioxidantes no sangue (Tozzi et al, 2002) e, na urina são encontrados marcadores do dano oxidativo do DNA e da peroxidação lipídica (Emond et al, 2000; Schultz et al, 2000).

Indivíduos com FRDA demonstram uma deficiência significativa na produção de ATP e uma fraca oxigenação do tecido muscular esquelético após o exercício físico (Lynch et al, 2002). A produção de energia no miocárdio é também deficiente, o que se correlaciona com o espessamento da parede ventricular que surge na cardiomiopatia hipertrófica, muitas vezes causa de morte na FRDA (Lodi et al, 2001; Bunse et al, 2003).

Correlação genótipo/fenótipo

Parece haver uma relação inversa entre o tamanho da expansão GAA e a idade de início da doença, apresentando a sintomatologia mais cedo os indivíduos com um maior número de repetições.

Expansões mais pequenas, com menos de 500 *repeats*, estão geralmente associadas a um início mais tardio dos sintomas. Dos dois alelos expandidos, é o mais pequeno que demonstra uma melhor correlação com o fenótipo (Filla et al, 1996; Lamont et al, 1997; Mateo et al, 2003). Consiste no principal factor de variabilidade da idade de início e da taxa de progressão da doença (Mateo et al, 2003).

Num estudo da população irlandesa, verificou-se também uma relação inversa entre o número de repetições do alelo de menor tamanho e a idade de início (McCabe et al, 2000), assim como uma relação inversa entre o número de repetições, quer do alelo menor, quer do de maior tamanho, e a idade em que se torna necessário o uso de cadeira de rodas. Apesar disso, não se encontrou uma correlação significativa entre o tamanho do *repeat* e outros índices de severidade da doença, incluindo o aparecimento da diabetes e cardiomiopatia (McCabe et al, 2000).

A cardiomiopatia é mais observada na presença de alelos de elevado tamanho (Durr et al, 1996; Filla et al, 1996). Esta manifestação clínica parece estar relacionada com a gravidade da doença e consequente início mais precoce (Montermini et al, 1997).

Foi descrita uma família com aparecimento na infância de uma hipertrofia cardíaca particularmente grave, que antecedeu mesmo o início da ataxia. Este probando além de homozigótico para expansões GAA de elevado tamanho, apresentava uma mutação no gene da troponina T cardíaca (Cuda et al, 2002).

A intolerância à glucose, e mesmo o aparecimento da diabetes, não parecem estar relacionados com o número de GAAs. Foram, no entanto, publicados estudos contraditórios a este respeito (Durr et al, 1996; Filla et al, 1996). Apesar da ausência de correlação com o tamanho da expansão, foi encontrada uma

relação entre a incidência da *diabetes mellitus* e uma idade de início mais precoce (Delatycki et al, 1999).

Apesar destas correlações genótipo/fenótipo, não é possível prever o desenvolvimento clínico em casos individuais. A variabilidade somática do tamanho da expansão GAA nos diferentes tecidos (mosaicismo somático) pode ser um mecanismo possível para explicar a fraca correlação entre o fenótipo clínico e o tamanho do *repeat* determinado a partir do DNA de leucócitos.

Verificou-se que nos doentes tipicamente FRDA, homozigóticos para a expansão GAA, o alelo de menor tamanho é significativamente maior do que acontece nos indivíduos com um fenótipo atípico.

Tratamento da FRDA

A terapia antioxidante com captadores de radicais livres, como a coenzima Q10, vitamina E, idebenona (análogo da coenzima Q10) têm sido consideradas numa tentativa de abrandamento da progressão da FRDA.

Testes clínicos com idebenona demonstram uma diminuição da hipertrofia cardíaca. Contudo, está ainda pouco claro se esta droga consegue prevenir e mesmo reverter a transição de hipertrofia a insuficiência cardíaca. Este medicamento, no entanto, não provoca modificação das manifestações neurológicas típicas da FRDA.

Seguindo doentes tratados com coenzima Q10 e vitamina E, verificou-se um aumento na produção de ATP no coração e músculo esquelético (Bidichandani et al, 2006).

Tem sido sugerido por alguns especialistas, o uso de agentes quelantes do ferro, que removam o seu excesso das células, e também antioxidantes como a vitamina E que remova as toxinas (Morgan M, 1997). Contudo, os estudos já realizados em doentes com FRDA tratados com vitamina E, apresentaram um sucesso limitado.

Não existem até á data medicamentos para o tratamento seguro e eficaz nem para a cura desta doença, embora esta pesquisa represente um objectivo significativo para os investigadores da área.

Antes que os doentes com FRDA possam ser tratados com quelantes de ferro e antioxidantes, é preciso confirmar que a acumulação de ferro na mitocôndria é na verdade, a causa primária da progressão da FRDA e de que este tipo de tratamento é seguro e efectivo.

O problema da medição da quantidade de ferro acumulado nos doentes com FRDA é também muito complicado uma vez que os minerais não são facilmente visualizados por técnicas não invasivas. Da mesma forma, a produção de radicais livres e o dano celular não podem ser quantificados em organismos vivos (Morgan M, 1997).

A terapia génica para compensar a perda de função da frataxina está também a ser investigada. No entanto, é ainda necessária muita pesquisa de base no laboratório, antes que a

terapia génica possa ser considerada para aplicação na prática clínica (Bidichandani et al, 2006).

Apesar de tudo, a possibilidade de se tornar disponível um tratamento eficaz da FRDA num futuro próximo, deve ser encarada de forma optimista.

.

Tratamento das manifestações clínicas

No presente, os doentes com FRDA apenas podem usufruir de tratamentos de suporte. Podem ter acesso a próteses, ajudas de locomoção, cadeiras de rodas, fisioterapia e terapia da fala, o que se torna muito importante para a manutenção de um estilo de vida activo, dentro do possível. Paralelamente, e não menos importante, um acompanhamento psicológico pode ser crucial para enfrentar uma nova situação de vida. Por vezes torna-se necessário uma intervenção da ortopedia para a escoliose e deformação dos pés (*pes cavus*).

Tratamentos relacionados com as alterações cardíacas e a diabetes, ajudam a melhorar a qualidade e duração da vida destes doentes.

Risco de transmissão

Para que se manifeste uma doença recessiva, é necessário herdar duas mutações patogénicas, uma de cada progenitor.

Assim sendo, na FRDA os progenitores de um indivíduo doente, são ambos portadores obrigatórios da mutação

causadora da doença. Dependendo das mutações encontradas no doente, os progenitores poderão ter cada um deles, ou uma expansão com um número de repetições patogénico, ou uma pré-mutação que sofreu expansão completa, ou ainda uma mutação pontual algures no gene da frataxina.

Os portadores de pré-mutações são muito raros, não se conhecendo ao certo a sua prevalência. Sabe-se no entanto, que são bastante menos comuns do que os portadores de alelos expandidos patogénicos (Bidichandani et al, 2006). As pré-mutações representam apenas cerca de 1% dos alelos não patogénicos (Montermini et al, 1997).

Consequentemente, uma hiperexpansão de pré-mutação como meio de transmissão da FRDA não é habitual.

Quando ambos os progenitores são portadores de alelos mutados, os irmãos de um indivíduo afectado têm, *a priori*, um risco de 25% de ser afectados, 50% de probabilidade de serem heterozigotos e 25% de chance de não terem qualquer mutação.

No caso de um dos progenitores apresentar um alelo mutado e o outro ser portador de uma pré-mutação, os irmãos do indivíduo afectado terão um risco inferior a 25% de o vir a ser também, uma vez que a pré-mutação pode continuar estável ou sofrer uma alteração mínima de modo a não se tornar patogénica. Neste caso, a probabilidade de serem portadores é de 25%, assim como de não terem nenhuma alteração no gene *FXN*.

Toda a descendência de um indivíduo afectado herdará pelo menos um alelo alterado do seu progenitor. No entanto, apenas estará em risco de vir a ser afectada pela doença se o outro membro do casal for portador de uma mutação patogénica (expansão ou mutação pontual). Se isso acontecer, o risco da descendência desenvolver a doença é então de 50%. Se em vez de mutação patogénica, tiver apenas uma pré-mutação, o risco decresce para menos de 50%. Como será de prever, a probabilidade de o parceiro do indivíduo afectado ser portador da mutação, dependerá da frequência dessa mutação na população em causa, ou de uma eventual consanguinidade entre o casal.

Os testes de portador nos familiares do indivíduo afectado vão depender das mutações encontradas neste.

O diagnóstico pré-natal, no caso de gravidezes com risco aumentado, é possível pela análise do DNA extraído de células fetais obtidas por amniocentese feita cerca das 15 semanas de gestação ou por colheita e vilosidades coriónicas (CVS) cerca das 11 semanas de gestação. Para que se proceda a este tipo de teste é fundamental que os progenitores tenham sido testados e neles encontrado um alelo patogénico.

O diagnóstico pré-natal está disponível para os casais com 25% de probabilidades de terem uma criança com FRDA, e para aqueles em que um dos progenitores é afectado e o outro portador.

1.2. A medicina preditiva

A medicina preditiva permite identificar indivíduos que tenham uma determinada condição hereditária, apesar de momentaneamente saudáveis. Algumas pessoas são submetidas a testes genéticos, apenas porque outros membros familiares foram identificados como tendo uma alteração genética. À medida que a medicina molecular evolui e o número de testes genéticos aumenta, aumenta também o número de pessoas que tomam conhecimento da posse de um gene associado a uma doença, sem terem, no entanto, desenvolvido qualquer manifestação clínica identificável. A sua única anomalia reside no seu genótipo. Embora saudáveis, estes indivíduos correm o risco de ser tratados pela sociedade em geral como doentes crónicos, formando uma nova classe social, a dos “doentes assintomáticos”.

Quanto ao problema da licitude da realização de testes genéticos em doenças incuráveis, a primeira resposta que ocorreria ao analisar esta questão, seria negativa, uma vez que de nada adianta (em termos de tratamento ou prevenção). Mas, haverá indivíduos que sentirão vantagem em conhecer o seu futuro (embora outros prefiram não o saber), pelo que a questão poderá assumir contornos diferentes (Oliveira, 1996/1997). O conhecimento da verdade poderá ajudar os indivíduos a construir a vida com base num facto inevitável.

O problema seria maior, se forem os pais a pesquisarem doenças incuráveis nos filhos menores. O conhecimento prévio por parte dos progenitores de que a criança virá um dia a desenvolver a doença, seria por um lado angustiante para eles, pois sentir-se-iam culpados pela transmissão de uma doença fatal, e por outro lado prejudicial para a criança pois pode originar insegurança e discriminação.

Uma outra questão que se levanta no âmbito dos testes preditivos é a de que as pessoas, em geral, não percebem com clareza que entre serem portadoras de um gene alterado e apresentarem a doença relacionada com este gene, existe uma probabilidade e não uma certeza. Sem esta percepção existe a vulnerabilidade a falsos alarmes ou a optimismo injustificado. Sendo assim, a (des)informação genética poderá às vezes ter consequências mais maléficas do que o próprio gene mutado.

É preciso notar que a pessoa humana e a sua dignidade transcendem os seus genes. Na maioria das doenças genéticas, as características individuais devem-se também ao ambiente, à educação e aos pressupostos culturais do meio.

Um outro problema que se levanta nesta matéria, é a leitura exagerada do papel da genética na determinação de traços comportamentais e psíquicos. Assim, tenta explicar-se tudo pela genética, desde a violência urbana à orientação sexual. O universo psíquico da pessoa humana, nas suas vertentes cognitiva e afectiva, constitui a essência da dignidade do ser humano enquanto pessoa, e uma explicação com base nos genes pouco elucidará sobre este ponto (Lesseps dos Reis, 1999).

Este reducionismo está incrustado na cultura da nossa sociedade e vai influenciar fundamentalmente a receptividade aos frutos do Projecto Genoma Humano (Pena , 2002).

A medicina preditiva deve ser sempre utilizada no pleno respeito pela pessoa, numa permanente luta contra qualquer tentativa que atente contra a dignidade do ser humano, seja na sua individualidade biológica, psíquica ou espiritual (Lesseps dos Reis, 1999).

Testes pré-sintomáticos e de portador

A medicina molecular diagnóstica continua a evoluir de forma a permitir o diagnóstico molecular de um número cada vez maior doenças genéticas humanas.

A medicina molecular preditiva, como o próprio nome indica, envolve a capacidade de prever a possibilidade do indivíduo vir a desenvolver determinadas doenças, com base em testes laboratoriais de DNA.

Enquanto ser humano (considerando as suas dimensões somática, psíquica e espiritual) qualquer indivíduo é resultante da interacção da sua individualidade biológica, com as influências que recebe ou absorve do meio que o rodeia, seja ele familiar, social ou físico (Archer, 1998).

A maioria das doenças comuns humanas é multifactorial, isto é, dependem de uma interacção complexa de vários genes (poligénica) e do ambiente. Sendo assim, outras características genéticas, factores ambientais ou factores de

etiologia desconhecida, poderão influenciar o aparecimento dessas doenças. Portanto, ao fazerem-se testes nestas situações, estar-se-ia a estabelecer um mapa individual de predisposições e não a fazer um teste pré-sintomático. Este último, diz respeito apenas a doenças monogénicas, e corresponde à detecção de alterações num só gene, causador único de doenças (que são raras).

Estes testes têm como objectivo, encontrar os indivíduos afectados por alterações genéticas que o afectarão a si próprio ou à sua descendência. Assim, os testes pré-sintomáticos dizem respeito a doenças genéticas dominantes, nas quais a alteração encontrada será com certeza responsável pelo desenvolvimento de uma doença num futuro mais ou menos próximo. Por outro lado, os testes de portador ou de heterozigotia estão relacionados com doenças recessivas e têm como objectivo verificar se o indivíduo tem uma alteração genética que, embora não sendo causadora de nenhuma sintomatologia, quando conjugada com uma alteração semelhante do outro progenitor poderá transmitir a doença à sua descendência.

No caso das doenças autossómicas dominantes de manifestação tardia, ou seja, aquelas que surgem com maior probabilidade na vida adulta e para as quais não se dispõe de qualquer intervenção clínica, as famílias em risco podem realizar testes pré-sintomáticos antes de desenvolverem a doença (sempre com o devido aconselhamento genético). Exemplos destas doenças são a paramiloidose, a doença de

Huntington, a doença de Machado-Joseph e outras ataxias cerebelosas.

Os testes pré-sintomáticos, assim como os testes de portador, têm como objectivo fundamental fornecer a adultos assintomáticos e em risco (próprio ou da descendência), o acesso à informação genética de forma a reduzir a incerteza sobre o seu estatuto genético, assegurando aos indivíduos o apoio necessário a uma adaptação saudável aos resultados e a evitar eventuais danos psicológicos (Projecto de Lei nº 455/VIII, 2001; Projecto de Lei nº 28/IX, 2002).

Aconselhamento genético

O aconselhamento genético é o processo pelo qual se oferece aos indivíduos e famílias afectadas, informação sobre a natureza, a forma de herança e implicações de doenças genéticas ajudando-os a tomar decisões médicas e pessoais (Bidichandani et al, 2006).

Devido ao impacto emocional dos testes genéticos preditivos, o indivíduo testado deve ser muito bem acompanhado por uma equipa multidisciplinar (médicos geneticistas, neurologistas, psicólogos, assistentes sociais e eventualmente outros profissionais), de forma a evitar fenómenos catastróficos como o suicídio, a tentativa falhada de suicídio e o internamento psiquiátrico. Estes fenómenos podem ocorrer mesmo em casos de testes negativos para a doença familiar em estudo (Sequeiros, 1996). É indispensável estabelecer condições de

acompanhamento psicológico e social, no caso particular das doenças com início na vida adulta e ainda sem cura ou tratamento disponível, dado que podem ser geradas graves perturbações emocionais, familiares e sociais, se tais cuidados não acompanharem o teste. A prática clínica e de aconselhamento genético no âmbito da medicina preditiva em Portugal, segue as orientações e recomendações internacionais para garantir a confidencialidade e evitar a discriminação em função do património genético. O aconselhamento genético é um procedimento que deve ter lugar antes, durante e depois do teste genético.

O protocolo do aconselhamento genético deverá incluir o historial da doença, os sintomas, o modo de transmissão (dominante/recessiva) e a avaliação de riscos, a informação dos procedimentos laboratoriais do teste pré-sintomático e de portador, as potencialidades do diagnóstico pré-natal e de outras alternativas desde a medicina reprodutiva até a adopção (Sequeiros, 1996).

Consentimento informado

A intervenção médica produz-se sempre nos termos de um contrato, mais ou menos elaborado. A necessidade de obter consentimento informado, legitimador das várias fases da intervenção, resulta da relação contratual estabelecida, como um dos seus requisitos ou um dos seus efeitos. No entanto, torna-se necessário obter o consentimento informado fora e

antes de qualquer relação contratual entre o médico e o doente. O dever do consentimento assenta no direito à integridade física e moral de cada indivíduo. No nosso sistema jurídico, este direito está consagrado no artº 25º da Constituição da República (defesa das relações em serviços públicos) e no artº 70º do Código Civil (defesa de relações entre particulares - clínica privada), no que diz respeito a ofensas à personalidade física e moral (Oliveira, 1992/1993).

Para a obtenção do consentimento, existe alguma flexibilidade legislativa, ditada pela ausência de normas formais impostas por lei, não deixando, no entanto, de se garantir que a informação seja suficiente para que o esclarecimento seja considerado completo. Para tal, poder-se-ão enunciar alguns critérios de aplicação do consentimento informado. A informação (oral ou escrita) deve exprimir-se em linguagem corrente sem termos técnicos: os elementos relevantes são aqueles que uma pessoa consideraria necessários para tomar uma decisão (padrão do doente médio); mas, devem ser também considerados aspectos que podem ser irrelevantes para o comum dos doentes, mas importantes para o paciente concreto (padrão subjectivo do doente); deve ser averiguado ainda se o interessado entendeu as explicações que lhe foram dadas. Por fim, o consentimento tem que ser prestado para cada acto médico ou para cada conjunto de actos que constituam uma unidade (Oliveira, 1992/1993).

Mesmo em casos de intervenções de carácter obrigatório, o consentimento não é dispensado, uma vez que o

esclarecimento favorece a adesão ao acto imposto, respeitando assim a dignidade individual.

Informação suficiente é requisito de validade do consentimento. Assim, se for provado que não foi prestada informação, ou que esta foi insuficiente para sustentar um consentimento esclarecido, o consentimento obtido é anulado e o acto médico passa a ser tratado como um acto não autorizado, com as consequências cíveis e penais (Oliveira, 1992/1993).

Do mesmo modo, no caso da medicina preditiva, o respeito pela autonomia de cada ser humano passa pelo imperativo de não intervir, ou seja, de não realizar exames genéticos, sem o consentimento informado. Este consentimento tem que ser livre de qualquer coacção e resultado de um completo esclarecimento acerca da possível detecção de genes mutantes, que serão determinantes de doenças ou susceptibilidades às mesmas, o que poderá ter consequências profundas no seu projecto de vida (Lesseps dos Reys, 1999). Para prestarem o seu consentimento, os indivíduos têm ainda que ter consciência acerca dos meios disponíveis de prevenção e tratamento da doença em causa (Lesseps dos Reys, 1999; Nunes, 2004).

Estes testes não devem ser realizados em pessoas com incapacidade mental, que possam não compreender as implicações deste tipo de testes e dar o seu consentimento (Lei nº 12/2005, artº 9º, nº6).

Os resultados devem ser comunicados ao próprio e não podem nunca ser comunicados a terceiros sem autorização expressa por escrito, incluindo a médicos ou outros profissionais de saúde de outros serviços ou instituições, não envolvidos no processo de teste dessa pessoa (Lei n° 12/2005, art° 9°, n°4).

**Acesso dos menores à realização de
testes pré-sintomáticos ou de portador**

Os menores estão sujeitos ao poder paternal, pelo que os pais têm o poder e o dever de “velar pela saúde” dos seus filhos (art° 1878°, n°1, Código Civil). Além disto, os pais têm o poder/dever de se substituírem aos filhos, sempre que seja necessário ou conveniente celebrar actos jurídicos, dos quais resultem direitos ou obrigações para os representados. Assim, são os detentores do poder paternal, os responsáveis pela prestação do consentimento das intervenções médicas nos menores (Oliveira, 1999/2000). No entanto, o art° 38° do Código Penal reconhece eficácia ao consentimento prestado por quem tenha mais de catorze anos e possua o discernimento necessário para avaliar o sentido e o alcance desse consentimento. Também o Código Civil, no art° 1878°, n°2, fala na autonomia progressiva dos menores, de acordo com a sua maturidade, não concretizando, contudo, uma idade específica. Assim, o sistema jurídico português considera menores com catorze anos e com o discernimento suficiente, capazes de formar uma decisão sobre as intervenções médicas,

no exercício da liberdade de se autodeterminarem em matéria de cuidados de saúde. Esta norma criou uma “maioridade especial” para o acesso a cuidados de saúde. Apesar disto, os detentores do poder paternal, devem manter os poderes de representarem o menor na realização de actos jurídicos de que resultem obrigações para o filho (como o internamento hospitalar, o pagamento de honorários) (Oliveira, 1999/2000).

A autorização do menor tem de ser acompanhada pelas garantias gerais de confidencialidade e pela protecção do segredo médico, mesmo relativamente aos pais. Quando o médico entenda que a quebra de segredo por revelação das informações clínicas aos pais, representa um interesse do menor superior ao da defesa da confidencialidade, pode fazê-lo com base nas regras de “colisão de direitos” (artº 355º do Código Civil) e do “direito de necessidades” ou do “conflito de deveres” (artºs 34º e 36º do Código Penal) (Oliveira, 1999/2000).

No caso específico da medicina genética preditiva, as normas são diferentes no que diz respeito à maioridade para a prestação do consentimento. A decisão de realizar exames genéticos nas crianças deve ser tomada com cuidada ponderação das situações específicas, no que diz respeito à natureza da doença, à idade de início e à possibilidade de tratamento ou prevenção. Os pais apenas podem solicitar a análise do genótipo do seu descendente quando a doença em questão se declara habitualmente antes dos 18 anos, ou se a criança pode beneficiar de medidas preventivas ou curativas antes dessa idade (doenças em que já existe tratamento)

(Archer, 1998). Só assim podem ser efectuados testes genéticos a menores, desde que sejam realizados em seu benefício e nunca em seu prejuízo, com o consentimento dos seus pais ou tutores, mas procurando-se sempre o seu próprio consentimento (Lei nº 12/2005, artº 17º, nº4).

A realização de testes pré-sintomáticos em doenças de manifestação tardia e de testes de heterozigotia para doenças recessivas, não é permitida a crianças e jovens com menos de 18 anos, se se tratar de doenças sem cura e sem tratamento e que habitualmente têm início na idade adulta. Muito excepcionalmente, podem fazer-se em jovens entre 16 e 18 anos, se forem pedidos pelos próprios e se tiverem como objectivo tomadas de decisão importantes, como a constituição de família (Sequeiros, 1996 ; Despacho nº 9108/97). Outras recomendações internacionais também referem a possibilidade de realização de testes de portador em menores, apenas em casos excepcionais, nos quais esses resultados possam fornecer informação crucial para um familiar, informação essa que não possa ser obtida de outra maneira, por exemplo, uma informação haplotípica (Borry, 2006). Um outro caso referido, é quando a ansiedade dos pais para saberem o estado de portador do seu filho é tão elevada que acaba por prejudicar mais seriamente a criança e a família do que propriamente a realização do teste. Alguns especialistas pensam mesmo que uma criança consegue desenvolver melhor mecanismos de “coping” para encarar o seu estado de portador, o que faria com que diminuísse bastante os níveis de

ansiedade dos seus pais e favorecesse o processo de consciencialização do seu estatuto genético. No caso dos menores, uma boa solução pode ser um aconselhamento genético que o ajude a compreender e a melhor decidir se pretende fazer um teste genético quando estiver preparado (Borry, 2006).

Quando se descobre acidentalmente um estado de portador num menor (ou num rastreio, ou num diagnóstico pré-natal em que os pais desistem da interrupção voluntária da gravidez, ou até no contexto de investigação científica), esse resultado não deve ser comunicado aos pais nem aos menores. Essa informação deve ser guardada separadamente da ficha médica da família, de forma a evitar uma descoberta acidental por parte dos seus elementos, e só então, mais tarde, quando o menor atingir a idade reprodutiva lhe deve ser comunicado (Borry, 2006).

Confidencialidade e protecção de dados genéticos

Segundo a Lei nº 12/2005 entende-se por base de dados genéticos (BDG) "qualquer registo, informatizado ou não, que contenha informação genética sobre um conjunto de pessoas ou famílias". As regras de criação, manutenção, gestão e segurança de BDG são remetidas para a legislação própria que regula a protecção de dados pessoais.

A Comissão Nacional para a Protecção de Dados (CNPd) desempenha funções importantes na defesa dos princípios

constitucionais e legais, que acautelam os direitos dos cidadãos em relação ao processamento de dados pessoais, particularmente no que respeita a dados sensíveis.

A CNPD já se pronunciou sobre a problemática de dados genéticos na autorização nº 67/97 de 10 Julho, na deliberação nº 86/98 de 15 de Outubro e na autorização nº 2/99 de 17 de Dezembro. A Comissão tem vindo a considerar que os dados genéticos “...constituem, isolada ou cruzadamente, indicadores que permitem revelar o estado de saúde, ou pelo menos possibilitam ou facilitam diagnósticos que identificam eventuais estados patológicos, designadamente quanto a factores de risco para o desenvolvimento de determinadas doenças, incluindo as que têm carácter hereditário ou com possibilidade de transmissão...” (CNPD - Autorização 9/2000).

Na Lei nº 10/91 de 29 de Abril, foram integrados os dados genéticos na categoria de “dados sensíveis” pelo que se atribuiu aos dados genéticos uma protecção reforçada, na medida em que ultrapassam em muito uma mera identificação da pessoa, e que representam o património da própria existência, a matriz pessoal de cada um. Os dados genéticos podem ter uma utilização directa ou indirecta, não apenas na leitura dos factores hereditários, mas igualmente do próprio estado de saúde e, no extremo, poderão tocar e afectar o núcleo da privacidade e afectar direitos fundamentais (Lei nº 10/91; Lei nº 28/94).

A nova lei de protecção de dados - Lei nº 67/98 de 26 de Outubro, passou a tipificar expressamente os dados genéticos

como dados sensíveis, proibindo como princípio o seu tratamento (artº 7º, nº1). Posteriormente, na deliberação nº 86/98, a Comissão considerou que a natureza dos dados genéticos pode variar em função da finalidade e do serviço que os trata. Os dados recolhidos podem ter uma finalidade exclusivamente médica, quando a informação recolhida se destina à prevenção, diagnóstico ou à prestação de cuidados de saúde ao titular ou à sua família, ou a fins similares como os epidemiológicos ou de investigação científica/médica (CNPD-Autorização 9/2000).

A recomendação do Conselho da Europa nº R(92)3, relativa aos testes genéticos para fins médicos, refere que os dados genéticos coligidos e tratados devem ser conservados separadamente de outras informações pessoais. A recomendação nº R(97)5 considera que o tratamento de dados genéticos deverá ser permitido exclusivamente por razões de saúde, devendo o indivíduo testado estar informado da finalidade e da possibilidade de acesso aos dados por parte do médico por ele escolhido, para assim poder dar o seu consentimento.

Em termos de segurança, deve haver uma separação lógica entre os dados de identificação, dados administrativos, dados médicos, dados sociais e dados genéticos. Quando os dados são processados no âmbito da realização de diagnósticos, da medicina preditiva, da prestação de cuidados ou tratamentos médicos ou da gestão de saúde, o seu tratamento automatizado é permitido, desde que feito por pessoas

vinculadas ao segredo profissional. É, no entanto, necessário que o mesmo seja notificado à CNPD. Neste processo, deve ser assegurado o preenchimento do “termo de consentimento informado” em relação aos dados genéticos para efeitos de investigação de doenças, quer no âmbito da execução de testes genéticos diagnósticos, quer no âmbito da execução de testes genéticos preditivos. É ainda necessária a restrição do acesso à informação, com adopção de *passwords*, para garantir que a informação não possa ser utilizada com finalidades diversas das declaradas (CNPD- Autorização 9/2000, 2000). As BDG que contenham informação familiar e os registos genéticos devem ser mantidas e supervisionadas por um médico com a especialidade em genética ou, na sua falta, por outro médico (Lei n° 12/2005, art° 7°, n°3).

1.3. Bancos de produtos biológicos

Um banco de produtos biológicos consiste em “qualquer repositório de amostras biológicas ou seus derivados, com ou sem tempo delimitado de armazenamento, quer utilize colheita prospectiva ou material previamente colhido, quer tenha sido obtido como componente de prestação de cuidados de saúde de rotina, quer em programa de rastreio, quer para investigação, e que inclua amostras que sejam identificadas, identificáveis, anonimizadas ou anónimas.”(Lei n° 12/2005, art° 19°, n°1).

Um banco de DNA consiste no armazenamento deste material para um possível uso futuro. Uma vez que as metodologias empregues nos testes e o nosso conhecimento dos genes, mutações e doenças está em constante desenvolvimento, o armazenamento do DNA dos indivíduos afectados, constitui um factor de necessária ponderação. Um banco deste tipo torna-se particularmente relevante em situações em que a sensibilidade dos testes oferecidos até ao momento é inferior a 100%.

Os biobancos representam uma área activa, em constante evolução, o que levanta vários desafios éticos e sociais. Torna-se necessário a confrontação de ideias de diversas áreas multidisciplinares juntando-se não só cientistas, mas também especialistas em ciências sociais e humanas, o sector clínico, o sector económico e a sociedade em geral. Os desafios éticos necessitam de ponderar a resistência e o desejo de usar fontes de material biológico, os diferentes pontos de vista e os vários conceitos envolvidos. A ética deve ser encarada como um promotor da partilha de fontes biológicas com uma transparência crescente, com o único objectivo do benefício das populações (Cambon-Thompson, 2004). A protecção apropriada dos indivíduos reside no desenvolvimento de mecanismos regulatórios eficientes, mas também na transparência.

Existe um número variado de possíveis fontes de DNA, como hospitais, rastreios de recém-nascidos, laboratórios de investigação, companhias farmacêuticas e de biotecnologia,

serviços forenses e vários bancos de sangue, células ou tecidos.

As colecções de DNA podem ser usadas com várias finalidades. Podem ser usadas na clínica, na investigação ou na indústria. Devem, por isso, ser definidas condições para a troca de material biológico ou informação dele obtida, entre instituições. As indústrias farmacêutica e biotecnológica estão a desenvolver bancos de produtos biológicos, tornando-se extremamente relevante descobrir quais os seus objectivos a este respeito. No entanto, é difícil traçar uma linha entre a investigação pública e privada uma vez que, frequentemente, investigadores de ambos os sectores estão envolvidos num mesmo projecto.

Biobancos na Europa

Segundo o grupo da “*American National Bioethics Advisory Comission*”, um banco de DNA consiste na possibilidade de armazenar DNA extraído, linhas celulares transformadas, sangue ou outros tecidos congelados, isto é, materiais biológicos para uma análise futura. Por sua vez um banco de dados de DNA é definido como um depósito de informação genética, obtida a partir da análise de material biológico, informação essa armazenada em computador ou não.

Pequenas e grandes colecções de material biológico armazenado têm surgido ao longo dos tempos, mas nenhuma em tão larga escala como com o estabelecimento da base de

dados genéticos da Islândia, que se alargou à escala nacional. Seguindo este exemplo, outros países têm planeado estudos populacionais a nível nacional, como a Estónia, Singapura, Tonga e Reino Unido (Godard et al, 2003).

Vários princípios éticos para o uso prospectivo de material genético humano e dados dele recolhidos, foram introduzidos em vários países da Europa (Inglaterra, Dinamarca, Holanda, França e, mais tarde, na Islândia e Estónia), uns através de recomendações, outros criando legislação apropriada.

As recomendações do Conselho da Europa para a protecção de dados médicos, publicadas em 1997, incluem já referência a dados genéticos, no que respeita a medidas preventivas de destruição accidental ou ilegal, assim como de acesso não autorizado, alteração ou comunicação desses dados. Estas medidas visam assegurar um elevado nível de segurança antecipando potenciais riscos. Alguns países adoptaram uma lei específica para assegurar que medidas apropriadas são aplicadas no que respeita ao armazenamento e uso da informação genética – Áustria em 1994, Estónia e Islândia em 2000. Mais recentemente (2005), foi aprovada uma lei em Portugal que também considera a regulamentação destes temas (Lei nº 12/2005, artº 19º).

Segundo um estudo efectuado pelo EUROGENBANK, que inquiriu 147 biobancos por vários países europeus, foi detectada alguma falta de harmonização nas condutas relativamente a esta actividade. Deste estudo, saíram algumas recomendações propostas à Comissão Europeia, e

que sugerem uma harmonização em rede sobre os pedidos de consentimento, adaptados aos vários contextos profissionais, o uso secundário das amostras e o direito de posse das amostras, construindo assim uma visão europeia uniforme para esta matéria, o que é considerado como um grande benefício (Hirtzlin et al, 2003).

Em conclusão, os biobancos constituem uma actividade crescente na Europa, estando a ser criados em várias instituições por tempo considerável.

Armazenamento das amostras

Os biobancos podem ser constituídos por amostras retrospectivas, que consistem em amostras colhidas com um propósito diferente daquele em questão, ou prospectivas, que são colhidas já com essa finalidade e respeitando o planeamento de determinado estudo.

Independentemente do carácter retrospectivo ou prospectivo da colecção de amostras biológicas, a “*American Society of Human Genetics*” (ASHG) definiu quatro tipos de identificação de amostras empregues no seu armazenamento.

Amostras anónimas são aqueles materiais biológicos colhidos sem identificação, sendo impossível qualquer ligação com as suas fontes. **Amostras anonimizadas** consistem nos materiais biológicos originalmente identificadas, mas com a identificação irreversivelmente eliminada, tornando-se impossível a ligação às suas fontes. **Amostras identificáveis**

consistem em materiais não identificados para a investigação, mas que podem ser ligados à sua fonte através de um código. Por último, **amostras identificadas** são aquelas com elementos identificativos como nome, número de doente, relação familiar, os quais estão acessíveis aos investigadores (Godard et al, 2003).

Por sua vez, a “*National Bioethics Advisory Commission*” (NBAC), nos Estados Unidos, usa uma terminologia diferente para a designação das amostras armazenadas nos biobancos, embora correspondente às designações anteriores em significado: não identificadas, não ligadas, codificadas e identificadas, respectivamente (Rockville, 1999).

O tipo de identificação das amostras vai depender muito dos objectivos do armazenamento - para fins de diagnóstico ou investigação- e do tipo de estudo e da informação necessária.

Para o armazenamento de qualquer amostra biológica, um dos requisitos fundamentais é a confidencialidade. Desta forma, toda a informação obtida a partir da amostra só pode ser acedida pelo próprio ou por quem ele designar. Esta norma é facilmente controlada em laboratórios de diagnóstico genético, mas na investigação biomédica torna-se mais difícil de controlar, pelo que os investigadores muito dificilmente conseguem assegurar confidencialidade absoluta aos sujeitos dos seus estudos. Segundo o comité de ética da ASHG, devem ser utilizadas amostras anónimas ou anonimizadas sempre que possível. Também na Holanda é sugerida esta recomendação. Na Suécia, é defendida a utilização de códigos

que possam permitir uma identificação da amostra em investigações posteriores, ainda que esse código deva ser separado dos dados identificativos, e a sua ligação sujeita a regras muito estritas de segurança e de acesso à investigação. A Comissão de Genética Humana no Reino Unido é defensora desta mesma política e da codificação de toda e qualquer informação relativa ao material biológico (Godard et al, 2003).

Em Portugal está legislado (Lei nº 12/2005) que só podem ser usadas amostras anónimas ou irreversivelmente anonimizadas, devendo as amostras identificadas ou identificáveis ficar limitadas a estudos que não possam ser feitos de outro modo (artº 19º, nº9). Em caso de absoluta necessidade, as amostras devem ser codificadas, ficando os códigos armazenados separadamente , mas sempre em instituições públicas (artº 19º, nº11).

Foi recomendado pela ASHG que os laboratórios de diagnóstico apenas poderiam aceitar amostras para armazenamento quando a pedido de profissionais de saúde.

Para que seja criado um biobanco, os depositários das amostras devem ser informados, ao dar o seu consentimento, dos serviços de que poderão usufruir, da duração do armazenamento das amostras, do encaminhamento do DNA findo o acordo de depósito ou morte do depositário e em que termos o DNA pode ser usado para outros fins que não os iniciais na altura do depósito. Deverão ainda ser esclarecidos acerca dos riscos do armazenamento, como a perda da amostra, e deve ser estabelecido um meio de contacto entre o

depositário e o biobanco (ASHG, 1996). Estas recomendações encontram-se citadas na lei portuguesa (Lei nº 12/2005, artº 19º, nºs 4, 5 e 6).

Segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), o material biológico deverá ser armazenado apenas durante o período em que possa vir a ser útil para o dador ou para seus familiares futuros. E, mesmo que usado para outros fins autorizados, deve permanecer armazenado material suficiente que seja útil para as próprias necessidades do doente (Manhalter, 2003).

Para o uso de material biológico humano, existe dois tipos de protecção pessoal, que são o consentimento informado obrigatório e a vigilância do comité de ética, necessário para assegurar um equilíbrio aceitável entre riscos e benefícios. Quando se trata de utilização destas amostras em investigação, existem países que sugerem ainda uma protecção mais específica para populações mais vulneráveis, incapazes de dar um consentimento consciente.

Como princípio básico de qualidade, os mecanismos de segurança para garantir a confidencialidade da informação genética e conservação a longo prazo de material genético, mostram-se condições essenciais de um biobanco.

As formas de controlar o armazenamento de material biológico variam entre a acreditação dos biobancos e a sua certificação voluntária. Para a regulação, são adoptadas medidas de segurança, quer no que diz respeito às condições de armazenamento, quer para evitar não conformidades pelo

acesso não autorizado às amostras, pela perda de amostras ou alterações no sistema informático do banco, entre outras situações.

Uma outra forma de controlo consiste na auto-regulação dos bancos. Neste caso, os profissionais responsáveis desenvolvem códigos de conduta, transcrevendo-os para um manual onde constam todos os direitos e obrigações das várias partes envolvidas no processo de armazenamento.

Segundo recomendações internacionais, as instituições a que pertencem os biobancos devem seguir as normas uniformemente estandardizadas para o armazenamento de material biológico, as quais deverão ser controladas por organismos de vigilância.

Consentimento informado para a colheita e armazenamento de amostras biológicas

Para todas as organizações, o consentimento informado para a criação de um banco de produtos biológicos parece ser de fulcral importância. As principais divergências surgem no tipo de consentimento e nas questões básicas que devem ser consideradas neste processo. Enquanto uns defendem que ao colher a amostra, o indivíduo deverá ser informado de todas as possíveis utilizações futuras, mesmo que não estejam no âmbito do objectivo principal da colheita, outros defendem que os dadores apenas devem ser informados acerca das medidas reguladoras adoptadas pelas instituições no que se refere ao

tempo de armazenamento, à destruição e eliminação das amostras e às condições de acesso por terceiros. O *British Medical Research Council Working Group* defende que um consentimento informado amplo, que cite um tempo ilimitado de armazenamento e uma possibilidade de utilização das amostras na investigação é fundamental. Caso contrário, os indivíduos teriam que voltar a ser contactados quando fosse necessário para a realização desses estudos (report of the Medical Research Council Working Group, 1999). Outros grupos, por sua vez, defendem que não é necessário o consentimento para o uso das amostras com outros fins científicos. Os argumentos usados são essencialmente de um provável retrocesso na pesquisa científica pela falta deste consentimento. Apesar disto, parece razoável que o indivíduo tenha a opção de recusar uma permissão para qualquer outro uso secundário, permiti-lo só em algumas condições, permiti-lo só para o estudo de determinada doença ou doenças, ou permiti-lo apenas de forma anónima.

Argumentando com a impossibilidade de obter consentimento de amostras retrospectivas, muitas instituições estão a usar as amostras para fins diferentes daqueles para os quais foram colhidas, desde que tenham o consentimento para o seu armazenamento. Deve, no entanto, ser assegurado que o paciente não tenha objectado a tal utilização e que a amostra tenha sido anonimizada (Godard et al, 2003).

A obtenção obrigatória do consentimento para investigação, vai depender do tipo de estudo, ou seja, se é retrospectivo ou

prospectivo, e do tipo de identificação da amostra armazenada no biobanco (Godard et al, 2003).

A ASHG continua a afirmar que os investigadores devem contactar os sujeitos do estudo para obter o seu consentimento caso não tenha sido obtido na altura da colheita (ASHG, 1996).

É importantíssimo que o paciente seja correctamente informado do propósito da pesquisa, suas limitações e vantagens, seus riscos e benefícios, qual o tipo de informação genética que daí pode resultar, como será a comunicação dos resultados e quais as estratégias regulamentares para manter a confidencialidade. Deve ser dada aos indivíduos a opção de escolha quanto a outras pesquisas que possam vir a ser realizadas, à possibilidade de partilha de amostras entre instituições, ao seu acesso às amostras, à duração do armazenamento, bem como ao seu direito de retirar as amostras do banco a qualquer momento. O paciente deve ser também informado da possibilidade de falhas no armazenamento com eventual perda da amostra (ASHG, 1996).

De acordo com o *Nuffield Council of Bioethics* e com o *Health Council of the Netherlands*, quando o paciente está lúcido o seu consentimento será válido. Quando não estiver em condições de o dar conscientemente, então, o princípio a seguir deverá ser o do melhor interesse para ele, o que deve ser decidido pelo médico e/ou familiares (Godard et al, 2003). Quanto à utilização *post-mortem* do material biológico, se o indivíduo colocou restrições à sua utilização em vida, então estas deverão ser mantidas depois da sua morte. Uma vez que estas

informações poderão afectar de certa forma os seus familiares, os indivíduos poderão colocar em vida restrições à sua utilização futura.

A ASHG considera que um consentimento branco e abrangente, para todas as possíveis utilizações futuras, é totalmente desapropriado, se as amostras são identificadas ou identificáveis. No entanto, a OMS, considera que um consentimento em aberto é a melhor forma para poder usar as amostras em investigações futuras, procedimento esse, mais eficiente e mais económico, evitando o dispendioso re-contacto com os indivíduos para a execução de cada novo projecto.

Apesar de um consenso universal na obtenção de consentimento para a utilização futura de amostras identificadas ou identificáveis, os requisitos apropriados para um consentimento do uso de amostras anónimas em estudos retrospectivos ou prospectivos, continuam a gerar controvérsia.

Cartões Guthrie

Existe uma variedade de potenciais fontes de amostras armazenadas, que podem ter uma utilização futura. A isso se chama um potencial banco de DNA, o qual é constituído por qualquer tipo de amostra biológica (armazenada de diversas formas) e que permite a obtenção de material genético a qualquer momento (Goldim et al, 1999).

O uso posterior de sangue armazenado em cartões do tipo *Guthrie* tem recebido especial atenção como fonte de pesquisa. Estes cartões resultam de programas de rastreio genético em recém-nascidos, sendo depois armazenados.

O reconhecimento da utilidade epidemiológica destas amostras tem intensificado as considerações éticas respeitantes à retenção, ao armazenamento e uso destas amostras de sangue seco em papel. As recomendações éticas para estudos epidemiológicos são baseadas na ideia do respeito pelas pessoas, nos princípios da beneficência e não maleficência, na justiça e articulação obrigatória entre os indivíduos e a comunidade como um todo (Asai, 2002).

Na maioria das vezes estas amostras são obtidas em rastreios neonatais de doenças graves e muitas vezes fatais, mas com disponibilidade de tratamento ou cuidados paliativos de intervenção precoce. Incluídas neste tipo de rastreios, estão a fenilcetonúria, o hipotiroidismo congénito, a fibrose cística e outras deficiências metabólicas.

Geralmente, não tem sido considerada como uma imposição, a obtenção de consentimento escrito nestes programas de rastreios genéticos quando se trata de doenças tratáveis, uma vez que os progenitores compreendem de imediato a mais valia para o seu bebé. Mas, a experiência demonstra que estas amostras podem ser muito úteis em vários contextos não relacionados com o rastreio. Se existir algum propósito da sua utilização em investigação, então é necessário o consentimento dos progenitores. Por outro lado, uma recusa

dos progenitores em submeter o seu filho a este tipo de rastreio só pode ser ultrapassada por ordem do tribunal, que deverá ter em consideração o melhor interesse para a criança (Skene and Bankier, 2004).

O armazenamento destas amostras, apesar dos perigos que representa, tem-se mostrado importante por vários motivos. Um deles, consiste em detectar uma falha no diagnóstico e voltar a oferecer o teste a todos os bebés avaliados nas mesmas condições. Por outro lado, as metodologias de diagnóstico vão evoluindo, e testes que não era possível oferecer numa determinada altura podem sê-lo no futuro. As amostras podem mesmo vir a ser testadas com um novo equipamento. Podem também ser feitos estudos retrospectivos no âmbito de aconselhamento genético de familiares. Este estudo é crucial para clarificar o risco de desenvolvimento de uma doença, e fornecer uma opção de diagnóstico pré-natal a outros membros da família afectada.

Existem já países onde é permitida a utilização destes cartões para identificação forense de indivíduos, que não é possível identificar de outra forma (ex: vítimas dos ataques bombistas em Bali). Também podem ser usados na identificação criminal de vítimas, mas nunca de suspeitos (Skene and Bankier, 2004). Estes cartões foram já usados num caso de averiguação oficiosa da paternidade na Nova Zelândia em 1999 (Kharaboyan et al, 2004).

O Conselho de Ética Dinamarquês propôs em 1993, que a utilização das amostras em cartões *Guthrie* em investigação

pudesse ser feita, mesmo sem consentimento, desde que anónimas (Godard et al, 2003). Em alguns casos, mesmo amostras identificadas poderão ser usadas sem o consentimento dos pais. O biobanco de *Guthries* dinamarquês é regulado por uma legislação específica, assumindo uma posição única dentro dos restantes biobancos de amostras biológicas. Consideram que as amostras *Guthrie* têm sido usadas com sucesso, não só no diagnóstico de doenças genéticas, constituindo um benefício para o próprio, mas também em investigação, o que representa um benefício para gerações futuras. Daí a excepção na necessidade de consentimento informado, mas apenas aprovação dos projectos pelas comissões de ética envolvidas (Norgaard-Pedersen, 1999).

Em 1995, a OMS recomendou que as amostras dos rastreios neonatais para doenças com tratamento possam ser usadas para fornecer informação epidemiológica sobre predisposições genéticas para doenças de início tardio. Deve, no entanto, ser assegurado que os testes permaneçam anónimos e que os resultados não possam ser comunicados aos indivíduos afectados ou suas famílias (World Health Organization, 1998).

O tempo durante o qual estas amostras podem ser armazenadas varia de acordo com as regulamentações nos vários países. Por exemplo, em Portugal, em alguns estados dos Estados Unidos, assim como na Dinamarca, podem ser armazenados indefinidamente, enquanto na Austrália apenas são conservados 2 anos. Na França os cartões são destruídos

após terminado o teste para o qual foram colhidos (Human Genetics Society of Australasia, 2004).

Também questões como a da propriedade das amostras ou a da necessidade de consentimento informado variam de país para país. Por exemplo, enquanto na Austrália se considera que as amostras pertencem ao laboratório que as testou e as armazenou, na Nova Zelândia as amostras são consideradas como pertencentes ao dador. Em ambos os países vigora o princípio da “recusa informada de consentimento”, em vez da necessidade de um pedido de consentimento. No entanto, este princípio deixa de ser válido quando se pretende fazer outros testes que não aquelas para os quais as amostras foram colhidas. Nestes casos, passa a ser necessário o consentimento informado, a anonimização das amostras e a aprovação da comissão de ética local (*Human Genetics Society of Australasia* e *Royal Australasian College of physicians*). O mesmo se passa no Japão e outros países orientais, onde se considera que a falta de consentimento informado para a investigação epidemiológica não significa necessariamente uma violação ética, não sendo por isso necessário a sua obtenção, desde que o comité de ética apropriado tenha aprovado o estudo (Asai, 2002).

No caso português, esta matéria está regulamentada na lei actual, incluindo-se nas determinações para os restantes bancos de produtos biológicos (Lei nº 12/2005, artº 19º).

O armazenamento das amostras de sangue em papel dos rastreios neonatais como fonte de material genético deve ser

considerado à luz dos potenciais benefícios e prejuízos para a sociedade. Mas, muito pouca legislação e recomendações foram elaboradas no que diz respeito à utilização e regulação destas amostras e às questões éticas envolvidas, nomeadamente no que diz respeito à confidencialidade. É necessário desenvolver mais regulamentação e fortalecer a já existente, para que se consiga assegurar a manutenção deste tipo de rastreios e o armazenamento das amostras, que constituem uma importante fonte de benefícios em termos epidemiológicos, de saúde pública e controlo de qualidade. Na ausência de regras uniformes, é urgente desenvolver regulamentação que considere o armazenamento e utilização secundária destes cartões e os dilemas éticos, legais e sociais. Uma comissão nos Estados Unidos -“*The Newborn Screening Committee of Regional Networks for Genetic Services*”- publicou uma declaração regulamentar com recomendações que permitem uma mais vasta compreensão das questões em causa (Therrell et al, 1996).

O consentimento informado obtido antes da utilização das amostras com outros fins, é visto como a melhor forma de proteger os interesses da criança, evitando problemas futuros no acesso às amostras e promovendo uma maior liberdade da pesquisa científica. No entanto, os sujeitos devem ser assegurados que a informação genética daí obtida e a sua privacidade estarão protegidos da injustiça de uma possível discriminação. Os sujeitos têm também o direito de saber o que poderão esperar das entidades a quem confiam o seu

material biológico. É uma espécie de acordo entre ambas as partes, que poderá trazer benefícios para os dois lados.

1.4. Rastreios genéticos

Os rastreios genéticos visam a identificação precoce de portadores e de indivíduos afectados, ou de uma predisposição ou resistência a determinada doença, numa população determinada. Os rastreios genéticos podem ser aplicados à população em geral ou a subgrupos específicos definidos com base em critérios que poderão ou não, estar relacionados com o seu estado de saúde (recomendações da “*European Society of Human Genetics*”- ESHG, 2000). Os rastreios genéticos englobam os rastreios de portadores (heterozigotos) para doenças recessivas e ligadas ao X, os rastreios pré-sintomáticos para doenças dominantes de início tardio, os rastreios pré-natais e os rastreios neonatais, os últimos dos quais iniciados há mais de 40 anos (McCabe et al, 2004; Rowley et al, 1984). Os programas de rastreio estão estabelecidos em muitos países, como uma prática de saúde pública. Os testes de rastreio pré-natal fazem já parte dos cuidados reprodutivos na sociedade moderna (Hodge, 2004). Rastreios direccionados representam um dos esforços oficiais de saúde pública, com vista à identificação de condições genéticas específicas que afectem grupos ou subgrupos populacionais. Consegue-se assim um tratamento (quando disponível) mais efectivo e económico,

que pode contribuir para um melhoramento na saúde colectiva de uma dada população. No entanto, um critério económico não pode por si só justificar a implementação de um programa de rastreio (ESHG, 2000).

As entidades que levam a cabo os rastreios neonatais, justificam esse rastreio como obrigatório, sob o princípio legal que autoriza o estado a proteger as crianças, não pedindo por isso, o consentimento escrito dos pais. Mas, ao considerar-se o princípio da autonomia individual, essa justificação para a realização de rastreios sem o consentimento informado (escrito, de modo a assegurar que foi transmitida toda a informação necessária), torna-se muito pouco credível (Hodge, 2004; Recomendação N°R(92)3, 1992). Os rastreios neonatais podem e devem ser firmemente recomendados e justificados com base num diagnóstico precoce e tratamento efectivo que possa claramente beneficiar o recém-nascido. De qualquer forma, o consentimento dos pais é muito importante porque mesmo que os benefícios suplementem os prejuízos, o teste só pode ser oferecido como opcional e os indivíduos são livres de recusar o teste, mesmo depois do aconselhamento (ESHG, 2000; Recomendação N°R(92)3, 1992).

O objectivo dos testes de portador para uma doença recessiva, consiste em identificar casais em risco de transmitir a doença à sua descendência. Se um dos membros de um casal é portador, então o teste de heterozigotia é oferecido ao outro. Aos casais em que ambos são portadores, é oferecida no contexto de aconselhamento genético, durante o qual são

discutidas todas as suas opções reprodutivas, a possibilidade de diagnóstico pré-natal (Vallance et al, 2003). Neste âmbito, foram já estabelecidos programas de rastreio pré-matrimonial de forma a um melhor aconselhamento dos possíveis portadores no que se refere a questões e opções reprodutivas.

Os rastreios de portadores para doenças recessivas começaram há já algum tempo, por volta dos anos 70, com a doença de Tay-Sachs em judeus Ashkenazi (Vallance et al, 2003), os programas de erradicação da talassémia em Chipre (Angastiniotis et al, 1990) e na Sardenha (Cao et al, 1984), e ainda, mais recentemente, também na Turquia (Keskin et al, 2001) e Tailândia (Sangkitporn et al, 2004). Um outro exemplo é o do rastreio da anemia das células falciformes em afro-americanos (Miller et al, 1979; Andrews, 1989; Ballas et al, 1994).

Com o aumento das facilidades laboratoriais e o desenvolvimento de testes mais fáceis, rápidos e económicos, tem vindo a discutir-se a aplicabilidade e utilidade de novos rastreios de heterozigotos para outras doenças recessivas, como é o caso da fibrose quística em populações de origem caucasiana, entre muitos outros (Godard et al, 2003). Esta facilidade pode, no entanto, levar a uma oferta sistemática de testes de rastreio, sem o apropriado acompanhamento médico que forneça as informações necessárias antes do teste e o aconselhamento durante e depois dos resultados. É por isso que os rastreios podem ser muito benéficos, mas também prejudiciais (ESHG, 2000).

Para que os rastreios populacionais de portadores para doenças recessivas sejam aceitáveis, a doença em causa deve ter uma elevada prevalência, ser clinicamente grave, mas ter cura ou tratamento eficaz disponível, bem como apresentar um teste fácil, específico de confirmação e susceptível de ser aplicado a toda ou grande parte de uma população (Recomendação N°R(92)3, 1992). Se não existe um tratamento ou prevenção eficaz para a condição genética rastreada, não existe uma razão válida para implementar um rastreio dessa doença. Por outro lado, sem aceitação pública, um programa de rastreio genético nunca terá apoio político nem o respectivo financiamento (Hodge, 2004).

Para saber se existe um grupo populacional de risco, e portanto alvo de um rastreio, torna-se necessária uma avaliação geral da população, o mais rigorosa e representativa possível (Vallance et al, 2003). É necessária uma extensa pesquisa para definir o risco em vários grupos etno-culturais e assim determinar intervenções eficazes (Godard et al, 2003).

No entanto, é muito importante considerar todos os aspectos éticos e legais que envolvem este tipo de rastreios, bem como um controlo rigoroso do uso e registo da informação genética obtida, levantando-se assim a questão dos registos genéticos e das bases de dados (McCabe et al, 2004).

Apesar dos benefícios dos rastreios genéticos para a saúde pública suportarem a sua existência para usos futuros, os riscos para os indivíduos e populações requerem consciência e responsabilidade. Preocupações éticas acerca do

consentimento informado, direito à privacidade e possibilidade de discriminação, não são de fácil resolução. O equilíbrio entre os direitos individuais e os interesses da comunidade deve ser bem ponderado (Hodge, 2004).

1.5. Ataxia de Friedreich em Portugal

Esta descrição tem como base a análise dos dados referentes a oito anos (1998 a 2005) de experiência de diagnóstico laboratorial da ataxia de Friedreich no Centro de Genética Preditiva e Preventiva (CGPP) do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) (dados não publicados).

Durante este período foram encontrados 74 doentes (66 famílias), 33 portadores assintomáticos, e apenas um indivíduo portador de uma pré-mutação com 38 GAAs (0,14% da totalidade de alelos testados). A pré-mutação representa 0,19% dos alelos normais encontrados (n=536).

Note-se que os portadores assintomáticos estão representados em menor número que os doentes, o que não corresponde à realidade da população em geral. No entanto, é de realçar que estes indivíduos só chegam até ao laboratório, ou à consulta do CGPP, após descoberta de um membro familiar afectado (probando).

Foram estudadas no laboratório amostras de 14 grávidas, pertencentes a famílias afectadas, as quais pretendiam saber

o seu estado de portador para poderem considerar a hipótese de diagnóstico pré-natal (DPN).

Destas, 9 apresentaram um genótipo normal pelo que não foi necessário prosseguir com o processo de DPN, enquanto que 5 revelaram ser portadoras da mutação. Em 3 destes casos, também os pais mostraram ter a mutação, pelo que se prosseguiu com o DPN. Num outro caso, o pai não apresentava nenhum alelo alterado, ficando assim excluída a necessidade de DPN; no caso restante, ambos os progenitores apresentavam a mutação mas o DPN não prosseguiu tendo este processo sido acompanhado numa outra consulta de genética.

Até Dezembro de 2005, foram requisitados ao laboratório 360 pedidos de teste para a FRDA. Desses, 251 correspondiam a pedidos de diagnóstico, enquanto os restantes 109 correspondem a testes de portador assintomático ou em portadores obrigatórios (progenitores de indivíduos afectados). Dos 251 pedidos de diagnóstico, 119 referiam-se à confirmação do diagnóstico, e 132 à sua exclusão. Esta é uma doença com alguma sintomatologia característica, mas com alguma sobreposição a outras formas de ataxia, pelo que um diagnóstico clínico pelos médicos que acompanham estes doentes, tem que excluir vários diagnósticos possíveis.

Dos 119 pedidos de confirmação (nos quais os médicos fizeram um diagnóstico clínico de FRDA), 70 (59%) foram confirmados molecularmente pela presença de dois alelos expandidos, ao passo que em 49 (41%) casos este diagnóstico não se

confirmou. Nestes casos, os doentes terão provavelmente uma outra forma de ataxia cuja sintomatologia poderia ser confundida com a da FRDA. No entanto, 5 destes indivíduos não confirmados mostraram apresentar uma mutação (GAA)_n sendo por isso heterozigóticos para a expansão.

Nestes casos, foi feita a pesquisa de mutações pontuais nos 5 exões do gene da frataxina (*FXN*), para confirmar ou excluir a hipótese de heterozigotia composta. Em 3 dos casos não foram encontrados nenhuma mutações pontuais. Estes doentes serão muito provavelmente afectados por outra forma de ataxia apresentando, no entanto, uma expansão GAA, o que poderia acontecer em qualquer indivíduo da população em geral.

Os outros dois casos (dois irmãos) apresentavam também uma mutação pontual no exão 5a do gene da frataxina, revelando-se assim heterozigóticos compostos e confirmando-se deste modo o diagnóstico molecular de FRDA. Estes 2 casos correspondem a 3% de heterozigóticos compostos na totalidade de doentes, o que se mostra equivalente aos 4% descritos na bibliografia (Bidichandani et al, 2006).

Dos 74 doentes encontrados, 71 foram pedidos de confirmação, enquanto que 3 foram pedidos de exclusão do diagnóstico. Na sua grande maioria (96%), estes doentes tinham, portanto, já um diagnóstico clínico bastante seguro.

Assim, ao observar o comportamento da população FRDA que chegou até ao laboratório durante estes 8 anos, pode-se estimar uma prevalência mínima da doença em Portugal de

0,7 : 100.000. No entanto, nem todos os doentes FRDA estão diagnosticados molecularmente e, por isso, muitos deles não entraram neste cálculo. A prevalência descrita na bibliografia é entre 2 e 4:100.000 (Bidichandani et al, 2006; Cossé et al, 1997).

O cálculo da frequência de portadores nesta população não faz qualquer sentido, uma vez que o enviesamento é enorme, se pensarmos que todos os portadores que foram estudados no laboratório pertencem a famílias afectadas já diagnosticadas e, portanto, com uma grande probabilidade de terem a mutação.

Nesta população verificou-se uma predominância de alelos expandidos entre os 700 GAAs e os 1200 GAAs, conforme está descrito na literatura para outras populações (Campuzano et al, 1996; Filla et al, 1996; Durr et al, 1996; Epplen et al, 1997). Os alelos mais frequentes (45%) apresentam tamanhos entre 700 e 900 GAAs, o que corresponde também ao mais habitual noutras populações estudadas (Bidichandani et al, 2006).

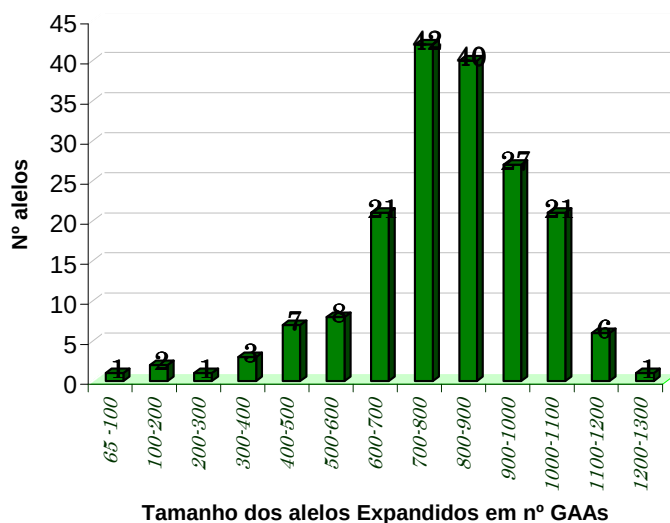


Fig.3. Distribuição das 180 expansões (GAA)_n encontradas, de acordo com o tamanho dos alelos (número de tripletos repetidos).

A média de expansões encontradas foi de 801 GAAs, enquanto que a moda, o seja o alelo mais representado nesta população, foi de 790 GAAs (Fig.3).

Nos doentes, foi também avaliado a relação entre o número de GAAs dos alelos expandidos (quer do de menor, quer do de maior tamanho) e a idade de início da doença.

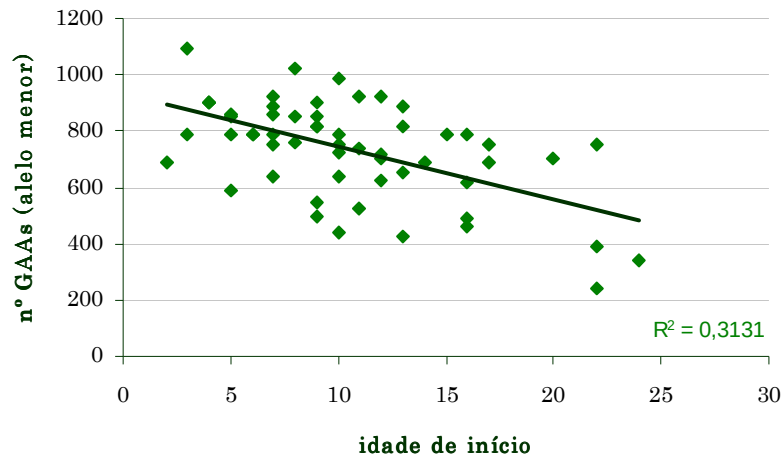


Fig.4. Relação entre o número de GAAs do alelo de **menor** tamanho nos doentes e a idade de início da sintomatologia.

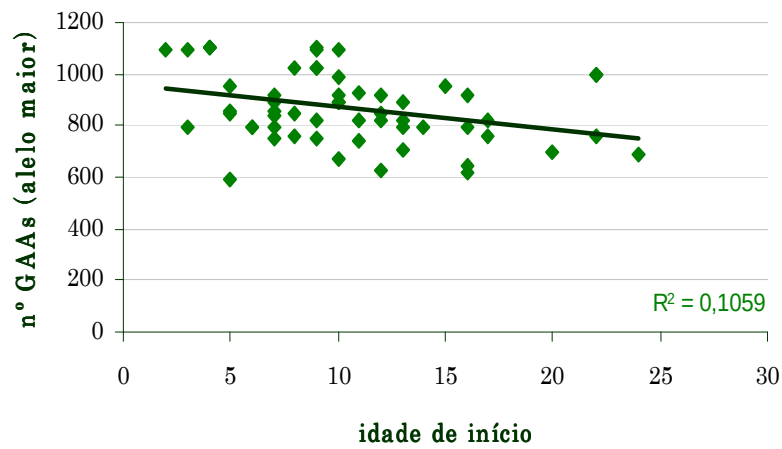


Fig.5. Relação entre o número de GAAs do alelo de **maior** tamanho nos doentes e a idade de início da sintomatologia.

Verificou-se uma relação inversa entre o número de GAAs nos alelos patogénicos e a idade de início da doença (Figs. 4 e 5) sobretudo para o alelo de menor tamanho, o que corresponde ao já descrito na bibliografia (Lamont, 1997; Mateo et al, 2003).

2. Razão do Estudo

2. Razão do estudo

2.1. Casos clínicos

No caso das doenças recessivas, só o nascimento de uma criança afectada permite dizer que existe a mutação nessa família e, assim, fazer-se o aconselhamento genético devido e a prevenção da doença em futuras gestações.

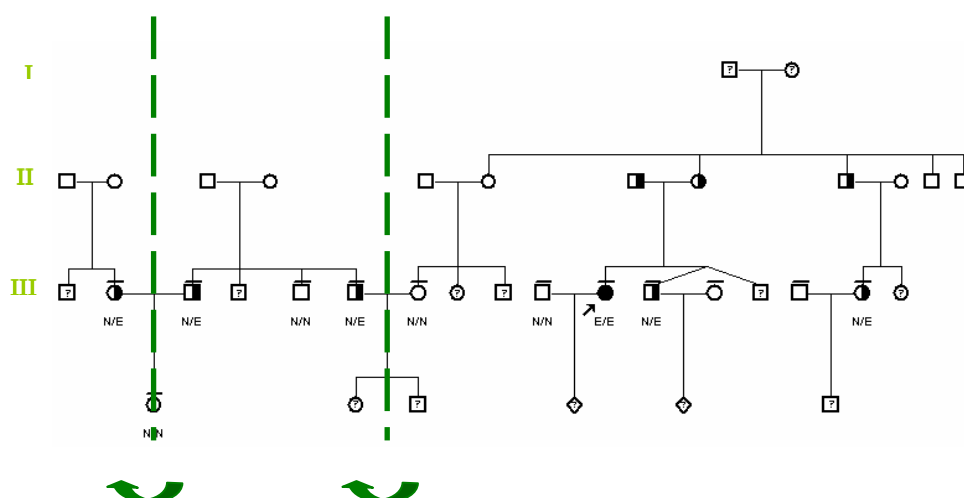
Foi seguida na consulta do CGPP a família de uma doente com ataxia de Friedreich (FRDA), a qual tem já o diagnóstico molecular confirmado. À medida que os casais detectavam uma gravidez em curso, foram procurando as consultas de aconselhamento genético querendo conhecer o risco do seu feto poder ser afectado. Outros familiares vieram também a estas consultas pela necessidade de averiguar o risco para eles ou para gerações futuras.

Este é um processo que se repete no aconselhamento genético destas famílias e é chamado “rastreo em cascata”.

No entanto, foi esta família em especial, que levantou a hipótese deste estudo. Devido a dois pedidos de diagnóstico pré-natal, descobriram-se duas novas famílias não aparentadas, que com esta se uniram por casamento, e nas quais se encontrou também uma expansão $(GAA)_n$ no gene da FRDA.

O risco *a priori* de cada um dos dois portadores não esperados que foram desse modo encontrados, seria de cerca de 1:60 a 1:100 (de acordo com o que se conhece, pela literatura, da sua frequência em outras populações caucasianas). No entanto, a coincidência de duas uniões com portadores vindos da população geral (sem consanguinidade) mostrou ser um pouco inesperada.

Árvore familiar : Caso 1

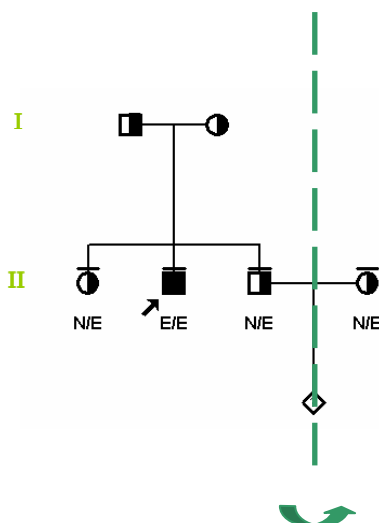


Por estar já confirmada a doença numa prima (III.11, a probanda, indicada com uma seta), a mulher III.7 quis ser testada para avaliar o risco de transmissão da mutação à descendência uma vez que já apresentava uma gravidez em curso. A consultanda não revelou ser portadora (heterozigótica) mas, inesperadamente, o seu cônjuge (que

apenas foi testado devido à gravidez em estadio avançado e à necessidade de se ganhar tempo) era portador. De outra maneira, este portador (III.6, representado como habitualmente com meio símbolo preenchido) nunca teria sido encontrado.

Alertados para a existência da mutação nesta nova família, os irmãos do cônjuge foram também testados, após aconselhamento genético. Mais uma vez, surgiu a necessidade urgente de testar a esposa (III.2) de um deles (III.3) que era portador, por se encontrar também já grávida, podendo haver pois, a necessidade de diagnóstico pré-natal (DPN). Esta mostrou ser também portadora tendo sido encontrada mais uma nova família (o DPN foi efectuado e o feto era normal e homozigótico para o alelo selvagem).

Árvore familiar : Caso 2



Uma outra família, chegou até ao laboratório enviada por um médico geneticista, que colocou ao casal a hipótese da necessidade de um DPN, uma vez que o progenitor (II.3) era portador da mutação FRDA. Também neste caso, o estudo do cônjuge (II.4) levou à descoberta de uma nova família portadora da mutação, que de outra forma nunca o saberia.

Estas famílias colocaram-nos questões éticas e legais importantes (levantadas pela detecção de uma mutação patogénica em pessoas de 3 famílias em que não se esperava encontrá-la, e em exames que normalmente não teriam sido feitos). Estes achados levantaram ainda a possibilidade de a frequência da mutação na população portuguesa ser mais elevada do que o descrito.

Não se conhecendo antes a prevalência da FRDA, nem a frequência da mutação e dos eventuais portadores em Portugal, este trabalho apresentou a resposta a estas perguntas, contribuindo para o estudo desta doença, a planificação de cuidados de saúde a estes doentes e famílias, e a sua prevenção, além de possibilitar a discussão das questões sociais, éticas e legais que então se nos colocaram.

3. Objetivos

3. Objectivos

3.1. Frequência de portadores para a FRDA

O primeiro objectivo deste trabalho, consistiu na determinação da frequência de portadores (heterozigotos) para a ataxia de Friedreich na população portuguesa, avaliando-se assim, indirectamente, a frequência da mutação responsável pela FRDA em Portugal.

- Tornou-se necessário discutir e avaliar a necessidade de um rastreio populacional para a ataxia de Friedreich em Portugal, e qual o tipo de rastreio ética e legalmente aceitável.
- Neste contexto, pretendeu-se avaliar a importância da medicina preditiva em saúde pública, nomeadamente na prevenção de doenças hereditárias, e quais as implicações éticas e legais associadas.

3.2. Discussão ético-legal sobre a utilização do biobanco de Guthries

O segundo grande objectivo consistiu na discussão ético-legal de bancos de amostras biológicas como o que foi usado para

este estudo (biobanco de *Guthries*), discutindo a sua importância em termos de saúde pública e desenvolvimento científico, bem como a legalidade dessa utilização para fins distintos dos da colheita e armazenamento, incluindo a discussão da necessidade de consentimento informado escrito para a criação destes bancos de produtos biológicos.

3.3. Discussão do enquadramento forense da medicina preditiva

Pretendeu-se, ainda, com este estudo, chamar a atenção para várias implicações da genética preditiva na sociedade actual, que possam constituir uma problemática médico-legal.

Torna-se necessário dotar os especialistas forenses dos meios necessários para a análise e discussão desta problemática.

Assim,

- Pretendeu-se realçar a possibilidade da utilização da medicina preditiva, assim como da genotipagem de DNA codificante, na resolução de casos forenses, discutindo a licitude desta utilização.
- Pretendeu-se discutir uma possível utilização de um biobanco de cartões *Guthrie* noutros contextos, incluindo o de investigação e o forense.

4. Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Amostra

Foi usada como população controlo, um conjunto de 1059 amostras de sangue conservado em cartões do tipo *Guthrie*. Estes cartões foram cedidos pelo Instituto de Genética Médica Dr. Jacinto Magalhães (IGM), onde são armazenados após o rastreio neonatal da fenilcetonúria e do hipotiroidismo congénito, que cobre cerca 99% da população portuguesa (Osório, 2006).

Requisitos das amostras

- As amostras foram solicitadas ao IGM, após submissão do projecto à Comissão de Ética do IBMC, com obtenção de parecer favorável;
- Foram usadas amostras anónimas, identificadas apenas com o distrito e com o sexo;
- Foi verificado que as amostras cedidas para este trabalho existiam em quantidade suficiente para não comprometer uma eventual e necessária utilização futura para fins médicos;
- As amostras foram recolhidas por um elemento do próprio IGM, sujeito ao dever de confidencialidade;

- As amostras utilizadas foram armazenadas antes do início de 2005, ou seja antes da saída da Lei nº 12/2005, a qual suscita ainda alguma controvérsia na sua interpretação relativamente à necessidade de consentimento informado para armazenamento e utilização futura deste biobanco em estudos de investigação.

Quantidade de amostras biológicas

Foram testadas 1059 amostras, distribuídas de acordo com o sexo: 529 do sexo feminino, 530 do sexo masculino.

O número de amostras por distrito foi calculado de acordo com a densidade populacional de cada distrito, segundo descrição na Tabela I. Foi calculada a percentagem da população de cada distrito em relação ao distrito mais populoso. Considerando 25, o número mínimo de amostras necessário testar (correspondendo a 50 cromossomas), no distrito menos populoso (Portalegre), foi calculado proporcionalmente o nº de amostras dos restantes distritos.

No entanto, no decurso do trabalho foi verificada a impossibilidade de testar o número total de amostras calculado, no tempo previsto, pelo que foi ajustado esse valor a um total de 1059 amostras, distribuídas de acordo com o distrito e sexo segundo a Tabela II.

Tabela I - Cálculo do número de amostras a testar de acordo com a densidade populacional de cada distrito (considerando 25 o número mínimo de amostras para o distrito menos populoso, Portalegre).

Distrito	População	proporção relativa	nº amostras
Lisboa	2135992	1,00	420
Porto	1781626	0,83	351
Braga	831368	0,39	164
Setubal	788459	0,37	155
Aveiro	713578	0,33	140
Santarém	475344	0,22	94
Leiria	459450	0,22	90
Coimbra	441245	0,21	87
Faro	395208	0,19	78
Viseu	394927	0,18	78
Viana do Castelo	250273	0,12	49
Vila Real	223731	0,10	44
Castelo Branco	208069	0,10	41
Guarda	173716	0,08	34
Évora	173408	0,08	34
Beja	161211	0,08	32
Bragança	148808	0,07	29
Portalegre	127018	0,06	25
Açores	244940	0,11	48
Madeira	260440	0,12	51
TOTAL:	20 distritos	TOTAL:	2044

Dados obtidos:

<http://www.ine.pt>, consultado em Novembro 2004

Tabela II. Número de amostras testadas de acordo com o distrito e sexo.

Distrito	Sx	Total / sexo	Total testado	Distrito	Sx	Total / sexo	Total testado
Lisboa	F	105	210	Viana do Castelo	F	14	28
	M	105			M	14	
Porto	F	88	177	Vila Real	F	12	24
	M	89			M	12	
Braga	F	41	82	Castelo Branco	F	12	24
	M	41			M	12	
Setubal	F	39	78	Guarda	F	10	20
	M	39			M	10	
Aveiro	F	35	70	Évora	F	10	20
	M	35			M	10	
Santarém	F	24	48	Beja	F	9	18
	M	24			M	9	
Leiria	F	23	46	Bragança	F	9	18
	M	23			M	9	
Coimbra	F	22	44	Portalegre	F	8	16
	M	22			M	8	
Faro	F	20	41	Açores	F	13	26
	M	21			M	13	
Viseu	F	21	41	Madeira	F	14	28
	M	20			M	14	
						TOTAL:	1059

Uma vez que o objectivo do trabalho consistia na determinação da frequência de uma mutação, consideraram-se no estudo um número total de 2118 cromossomas.

No distrito menos populoso foram estudados 32 cromossomas, o que foi considerado como uma boa representatividade desse distrito.

4.2. *Extracção de DNA*

A extracção de DNA das amostras de sangue seco em papel, foi efectuada com o *Kit* comercial “GENERATION® Capture Card Kit – DNA purification and elution from 3 mm disks of dried blood spots”, da *Gentra Systems*.

O protocolo de extracção utilizado foi o referido no manual de procedimentos do *Kit*. Foram cortados discos de 3 mms de raio, os quais foram lavados por duas vezes com 200µl de solução de purificação do DNA (incluída no *Kit*, G1-1000) com incubações a 50° C, durante 15 min. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 60° C, durante 15 min com 200 µl de solução de eluição do DNA (incluída no *Kit*, G2-0500). Por fim, as amostras foram submetidas a uma última incubação com 100 µl de solução de eluição do DNA a 99° C, durante 15 min. Esta solução contendo o DNA, foi transferida para criotubos de armazenamento (*Sarstedt* ,72.694.006) devidamente codificados.

A extracção foi feita em placas de 96 poços (*Robbins*, 1055-00-0), ou seja, 96 amostras em cada extracção, com as incubações efectuadas num termociclador *T-gradient*, *Biometra*.

4.3. Quantificação do DNA

Após extracção, as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (*GeneQuant, Amersham Biosciences*), com leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, em diluições com factor de diluição 1:20.

4.4. Preparação das amostras

A partir dos valores de concentração calculados pela fórmula:

$$C \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 50 \times 20 \text{ (factor de diluição)}$$

foram preparadas diluições de DNA a 20 ng/ μ l.

Foram observadas as razões A_{260}/A_{280} para avaliar a qualidade do DNA na sua generalidade.

4.5. Amplificação do gene da FRDA (FXN) por Polimerase Chain Reaction (PCR)

Amplificação dos alelos de tamanho normal

Foi preparada a mistura de reacção para um volume final de 32,0 µl por tubo [24,75 µl de água HPLC (*Merck*, 115333), 3,8 µl de tampão buffer 10x (*Invitrogen*), 0,95 µl de MgCl 50 mM, (*Invitrogen*) , 1,0 µl de dNTP-A a 4 mM cada, 1,0 µl de dATP 2 mM (*Amersham Biosciences*, 27-2035-01), 0,1 µl de cada um dos primers a 50 pmol/µl (*Pharmacia Biotech*) e 0,3 µl de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*, 18038-034)].

Sequência dos *primers*:

GAA-F – 5' gggATTggTTgCCAgTgCTTAAAagTTAg 3'

GAA-R – 5' gATCTAAggACCATCATggCCACACTTgCC 3'

(Campuzano et al, 1996)

Foram adicionados 8,0 µl de DNA a 20 ng/µl, perfazendo um volume final de reacção de 40,0 µl para cada amostra.

Os parâmetros de amplificação utilizados na reacção foram um ciclo inicial de 94° C durante 5'; 35 ciclos de 94° C durante 45", 66° C durante 45", e 72° C durante 2'; seguindo-se um ciclo final de 72° C durante 5'.

O produto amplificado foi conservado a 4° C.

Amplificação dos alelos expandidos ("long range PCR")

Foi preparada a mistura de reacção para um volume final de 40,0 µl por tubo [9,2 µl de água HPLC (*Merck*, 115333), 15 µl de tampão 3.3x XL bufferII (*Applied Biosystems*), 2,0 µl de Mg²⁺ 25 mM (*Applied Biosystems*), 7,5 µl de dNTP-A a 4 mM cada, 5,0 µl de dATP 2 mM (*Amersham Biosciences*, 27-2035-01), 0,4 µl de cada um dos primers a 50 pmol/µl (*Pharmacia Biotech*) e 0,5 µl de Taq DNA polimerase rtTh (*Applied Biosystems*, N808-0192)].

Sequência dos *primers*:

GAA104F – 5' ggC TTA AAC TTC CCA CAC gTg TT 3'

(Filla et al, 1996)

2500F – 5' CAA TCC Agg ACA gTC Agg gCT T 3'

(Campuzano et al, 1996)

Foram adicionados 10,0 µl de DNA a 20 ng/µl perfazendo um volume final de reacção de 50,0 µl para cada amostra.

Os parâmetros de amplificação utilizados na reacção foram um ciclo inicial de 94° C durante 1'; 10 ciclos de 94° C durante 15" seguidos 3'30"a 67° C; 20 ciclos de 94° C durante 15", 66° C durante 30" e 68° C durante 3' com incrementos de 20" por ciclo.

O produto amplificado foi conservado a 4° C.

4.6. Detecção dos produtos da amplificação em gel de agarose

Alelos normais

Os produtos resultantes da amplificação dos alelos de tamanho normal, foram corridos em gel de agarose (*Qbiogen*, AGAH0500) a 2% em diluição 50 vezes de TAE [242 g Tris-base (*Calbiochem*, 648311), 57,1 ml de ácido acético glacial (*Merck*, 1.00063.1000), 100 ml de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,5 M pH8,0 (*Panreac*, 1310261209) até 1000 ml], corado com 4 µl de brometo de etídeo (*Merck*, 111608).

As amostras foram corridas misturando 20,0 µl de amostra com xileno cianol (*Sigma*, X-4126) em 40% (p/v) de sacarose (*Merck*, 1.07651). Juntamente com as amostras correu também um marcador de pesos moleculares de 100 pares de bases (pb) (*Fermentas*, SM0321).

A voltagem utilizada foi de 90 a 120 V.

A visualização dos geles foi efectuada no sistema de detecção de imagem *Typhoon, Amersham Biosciences*.

O tamanho dos alelos foi determinado por leitura no marcador de pesos moleculares (em pb) e aplicação da fórmula:

$$\text{N}^\circ (\text{GAAs}) = (\text{n}^\circ \text{ pb} - 457) / 3$$

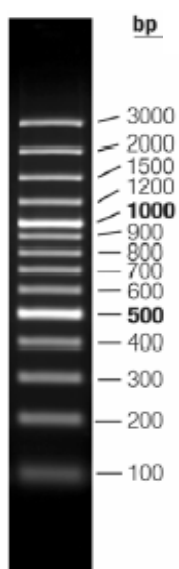


Fig. 6. Marcador *Gene Ruler* plus 100 pb (Fermentas)

Alelos expandidos

Os produtos resultantes da amplificação da “long range PCR”, foram corridos em gel de agarose (*Qbiogen*, AGAH0500) a 1% em diluição 50 vezes de TAE [242 g Tris-base (*Calbiochem*, 648311), 57,1 ml de ácido acético glacial (*Merck*, 1.00063.1000), 100 ml de EDTA 0,5 M pH8,0 (*Panreac*, 1310261209) até 1000 ml], corado com 4 µl de brometo de etídeo (*Merck*, 111608).

As amostras foram corridas misturando 20,0 µl de amostra com azul de bromofenol (*Sigma*, B-0126) em 40% (p/v) de sacarose (*Merck*, 1.07651). Juntamente com as amostras, correu também um marcador de pesos moleculares de 1Kb (*Fermentas*, SM0311).

A voltagem utilizada foi de 90 a 120 V.

A visualização dos geles foi efectuada no sistema de detecção de imagem, *Typhoon, Amersham Biosciences*.

O tamanho do alelo expandido foi determinado por leitura no marcador de pesos moleculares (em pb) e aplicação da fórmula:

$$N^{\circ} \text{ (GAAs)} = (n^{\circ} \text{ pb} - 1230) / 3$$

Na leitura do nº de pb, foi considerada a migração numa razão logarítmica, pelo que foi adoptada como regra de leitura a subtracção de um nº de pb específico de acordo com o tamanho dos fragmentos:

- para alelos >2000 pb, foram retirados 150 pb a cada leitura;
- para alelos 1500 pb>A>2000 pb, foram retirados 50 pb;
- para alelos <1500 pb não foi subtraído qualquer valor.

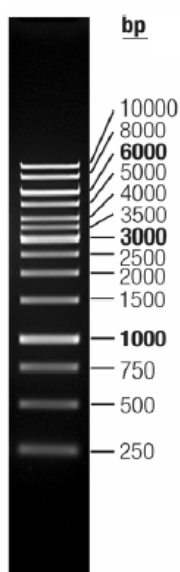


Fig. 7. Marcador *Gene Ruler* 1 Kb
(Fermentas)

4.7. Estratégia de amplificação

Numa primeira fase, foram amplificados para todas amostras, os alelos dentro da amplitude normal. Após visualização dos produtos em gel, só as amostras com um alelo único foram amplificadas para os alelos expandidos.

As restantes amostras (nas quais se observou uma distinção clara de dois alelos de tamanho normal) não foram testadas de outra forma.

4.8. Southern blotting

Transferência do DNA para membrana de *nylon*

Os produtos de amplificação da “long range PCR” foram transferidos para uma membrana de nylon *Hybond N+* (*Amersham Biosciences*, RPN303B) durante 3h, após desnaturação do gel numa solução de NaOH 0,4 M (*Merck*, 1064981000) e NaCl 1,5 M (*Calbiochem*, 561441), durante 30 min com agitação lenta. A membrana de nylon foi neutralizada numa solução de Tris-HCl 0,5 M pH7 (*Calbiochem*, 648313) e NaCl 1M (*Calbiochem*, 561441) , durante 10 min.

A membrana foi sujeita a “crosslink” (para ligação covalente do DNA à membrana), no aparelho *Ultraviolet crosslinker*, *Amersham Life Sciences*.

Marcação da sonda com fósforo radioactivo (^{32}P)

Para a marcação da sonda $(\text{GAA})_{10}$, foram incubados a 37°C , durante 1 h, 50 μl de uma mistura de incubação composta por: 1 μl de sonda a 50 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ (*Pharmacia Biotech*), 10 μl de tampão “terminal transferase 5x buffer” (*Promega*), 1,5 μl de enzima “terminal deoxynucleotidyl transferase recombinante” a 30U/ μl (*Promega*, M1875), 3,0 μl de $\alpha\text{-dCTP-}^{32}\text{P}$ (Amersham Biosciences, AA0075) e água HPLC (*Merck*, 115333), até perfazer o volume final.

Sequência da Sonda: 5' $(\text{GAA})_{10}$ 3'

(Campuzano et al, 1996)

Hibridação da membrana com ^{32}P

A membrana foi hibridada com uma sonda marcada com ^{32}P , em 15 ml de “Mix Amasino” [140 ml de SDS 20% (p/v) (*Calbiochem*, 428023), 80 ml de PEG 50% (p/v) (*Calbiochem*, 528877), 20 ml de NaCl 5M (*Calbiochem*, 561441), 26 ml de NaH_2PO_4 1M (*Calbiochem*, 567549), 26 ml de Na_2HPO_4 1M (*Calbiochem*, 567547) e água destilada até um volume final de 400 ml], durante 3h a 42°C . O volume de sonda utilizado na hibridação variou com a intensidade do radioisótopo, entre 5 e 15 μl .

Após hibridação a membrana foi submetida a três lavagens sequenciais de 30 min cada, a 42° C, com uma solução de lavagem de SSC 2x pH7,0 [diluição 10 vezes de 175,3 g NaCl (*Calbiochem*, 561441) e 88,2 g C₆H₅O₇Na₃ (*Calbiochem*, 567446) até 1000ml], e SDS 0,1% (p/v) (*Calbiochem*, 428023).

Autorradiografia

A membrana foi seca e exposta a película autorradiográfica (*Kodak*, 8715187), numa cassete - *Hypercassete™*, *Amersham Life Sciences* - durante um período correspondente ao sinal de marcação da sonda (em cps, *counts per second*, de radioactividade).

Após a exposição necessária, a película foi revelada num revelador automático, *Kodak*.

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Detecção dos produtos da amplificação em gel de agarose

Gel de agarose a 2% (alelos normais)

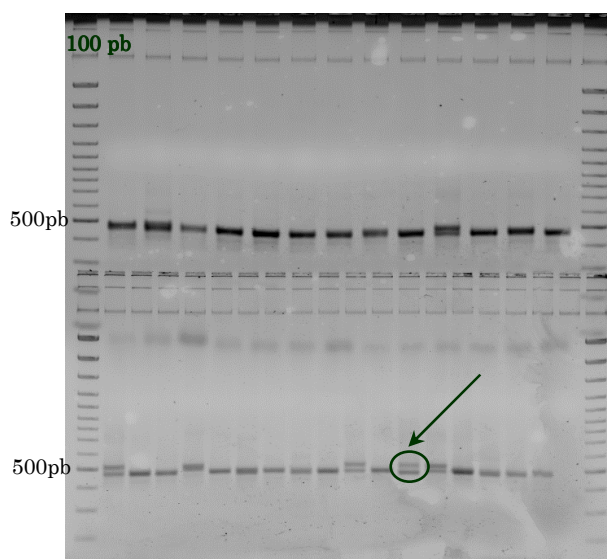


Fig.8. Corrida em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação dos alelos normais do gene *FXN* (seta indica a presença de 2 alelos normais que podem ser facilmente distinguidos desta forma).

Como já foi referido (4.7.), as amostras em que foi possível obter uma distinção clara entre dois alelos de tamanho normal (Fig.8) foram excluídas de testes posteriores.

Os tamanhos dos alelos foram calculados de forma aproximada, por leitura com o marcador de pesos moleculares e aplicação da fórmula descrita na secção 4.6.

Gel de agarose a 1% (alelos expandidos)

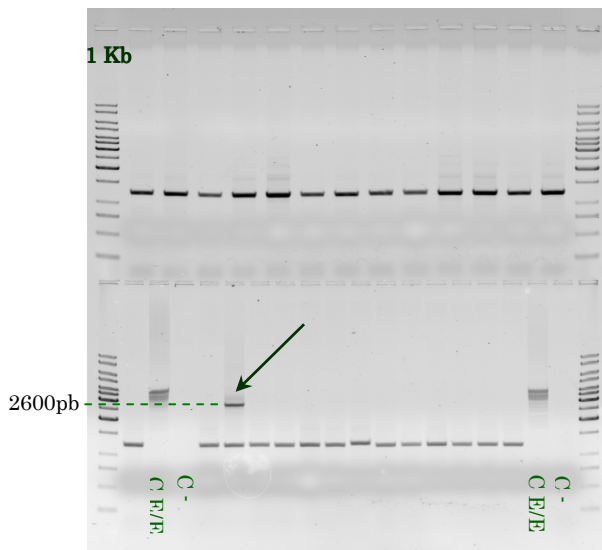


Fig.9. Corrida em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação dos alelos expandidos do gene *FXN* (*long range PCR*). Visualização de um alelo expandido de elevado tamanho (seta). Corrida em paralelo de um controlo positivo (CE/E) e de um controlo negativo (C-).

Na Fig.9 a seta indica um alelo expandido de elevado tamanho. No caso deste alelo o tamanho calculado de acordo com a fórmula indicada na secção 4.6 é:

$$N^{\circ} \text{ (GAAs)} = (2600 \text{ pb} - 150 - 1230) / 3 = 407 \text{ GAAs}$$

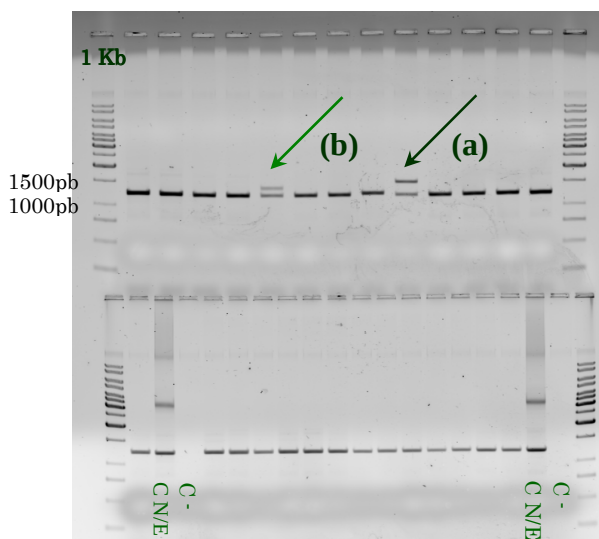


Fig.10. Corrida em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação dos alelos expandidos do gene *FXN* (*long range PCR*). Visualização de um alelo expandido de pequeno tamanho (a) e de uma pré-mutação (b). Corrida em paralelo de um controlo positivo (CN/E) e de um controlo negativo (C-)

Na Fig.10, a seta (a) indica uma alelo expandido de pequeno tamanho. No caso deste alelo o tamanho calculado de acordo com a fórmula indicada na secção 4.6 é:

$$N^{\circ} (\text{GAA}) = (1500 \text{ pb} - 1230) / 3 = \mathbf{90 \text{ GAAs}}$$

A seta (b) indica uma pré-mutação. No caso deste alelo o tamanho calculado de acordo com a fórmula indicada na secção 4.6 é:

$$N^{\circ} (\text{GAA}) = (1350 \text{ pb} - 1230) / 3 = \mathbf{40 \text{ GAAs}}$$

Southern blotting

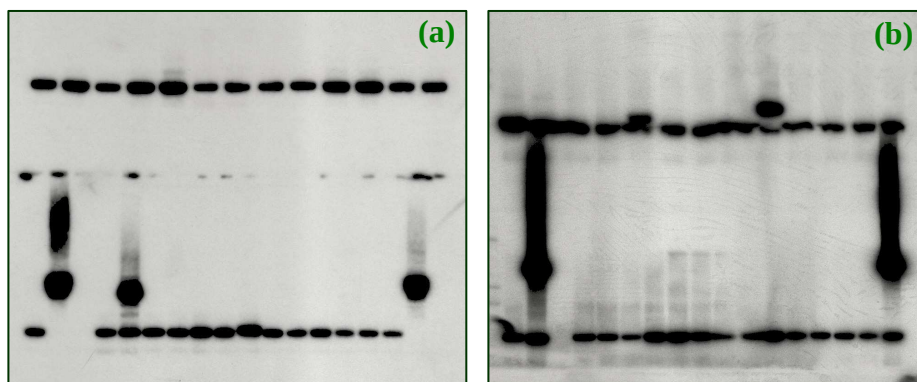


Fig.11. *Southern blotting* correspondente aos geles representados nas Fig.9 (a) e Fig.10 (b). Hibridação com o radioisótopo ^{32}P , das membranas de transferência dos produtos de amplificação dos alelos expandidos do gene *FXN*.

A Fig.11 representa um exemplo dos resultados obtidos após hibridação com radioactividade (^{32}P) das membranas resultantes da transferência dos produtos amplificados para os alelos expandidos do gene da FRDA, onde a visualização dos mesmos se tornou bastante mais evidente.

5.2. Avaliação da distribuição alélica na população estudada

Os alelos foram divididos em quatro grupos de acordo com o número de repetições GAA. Os alelos com menos de 12 GAAs foram designados por SN (*small normal alleles*), os alelos entre 12 e 33 GAAs foram designados como LN (*large normal alleles*), os alelos entre 34 e 64 foram considerados como pré-mutações (PM), enquanto que os alelos com mais de 65 GAAs pertencem ao grupo de alelos expandidos (Exp).

Foram estudados um total de 2118 cromossomas.

Distribuição alélica na população total

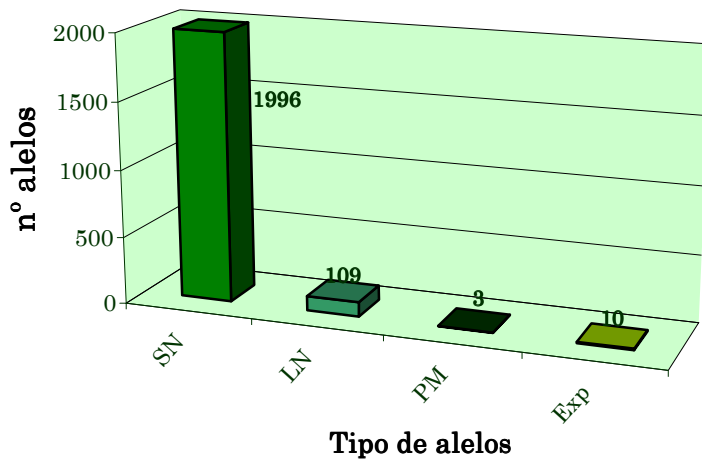


Fig.12. Distribuição alélica (SN <12 GAAs ; 12 GAAs <LN< 33 GAAs ; 33 GAAs <PM< 64 GAAs ; Exp > 65 GAAs) a nível nacional, num total de 2118 cromossomas estudados. Indicação do número de alelos encontrado em cada um dos grupos considerados.

Como se pode verificar pela Fig.12, a grande maioria dos alelos encontrados apresentou um tamanho pequeno, com menos de 12 GAAs (94%). Os alelos normais de maior tamanho (LN) estavam menos representados (5%) na totalidade de cromossomas estudados.

Tipos de alelos encontrados em cada distrito

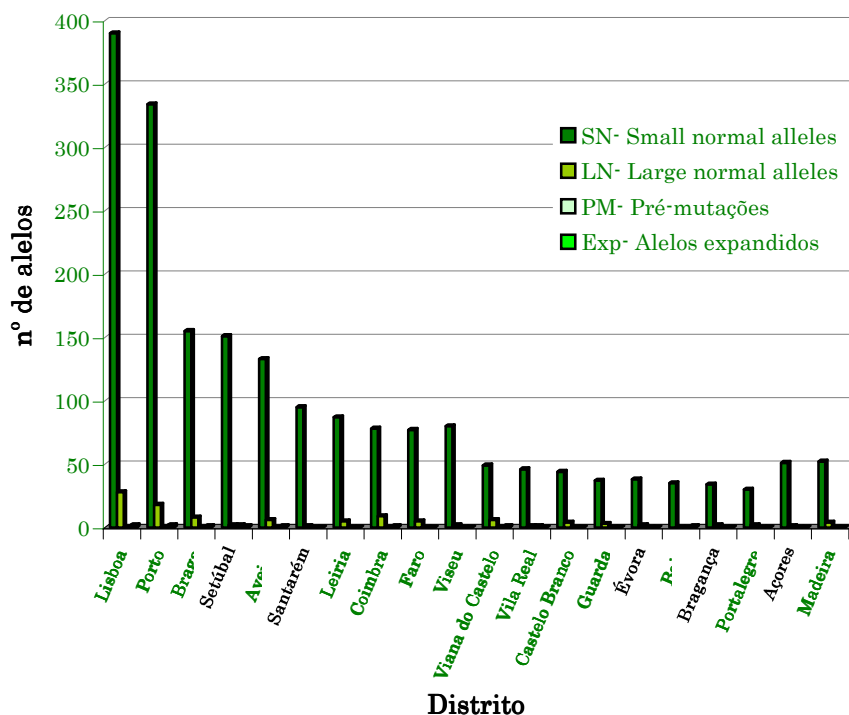


Fig.13. Distribuição alélica (SN <12 GAAs ; 12 GAAs <LN< 33 GAAs ; 33 GAAs <PM< 64 GAAs ; Exp > 65 GAAs) em cada um dos 20 distritos.

Após distribuição dos diferentes tipos de alelos (SN, LN, PM, expansões) por distritos, observou-se uma distribuição semelhante à obtida a nível nacional (Fig.12), com uma predominância clara dos alelos SN em todos os distritos estudados (Fig.13).

Variação dos diferentes tipos de alelos com o sexo

Foi considerada a variação de cada tipo de alelo (SN, LN, PM, Exp) de acordo com o sexo.

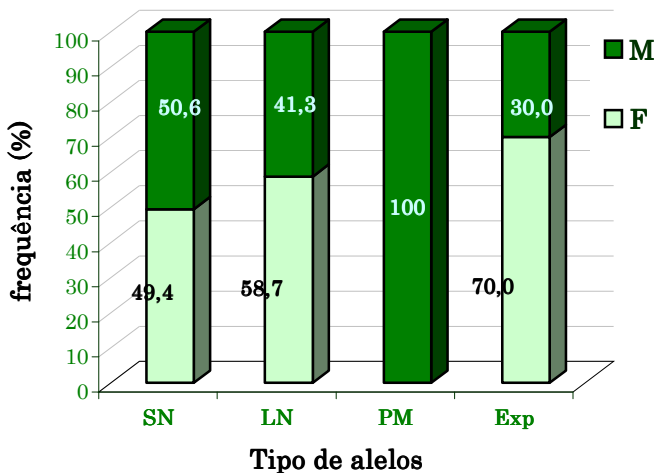
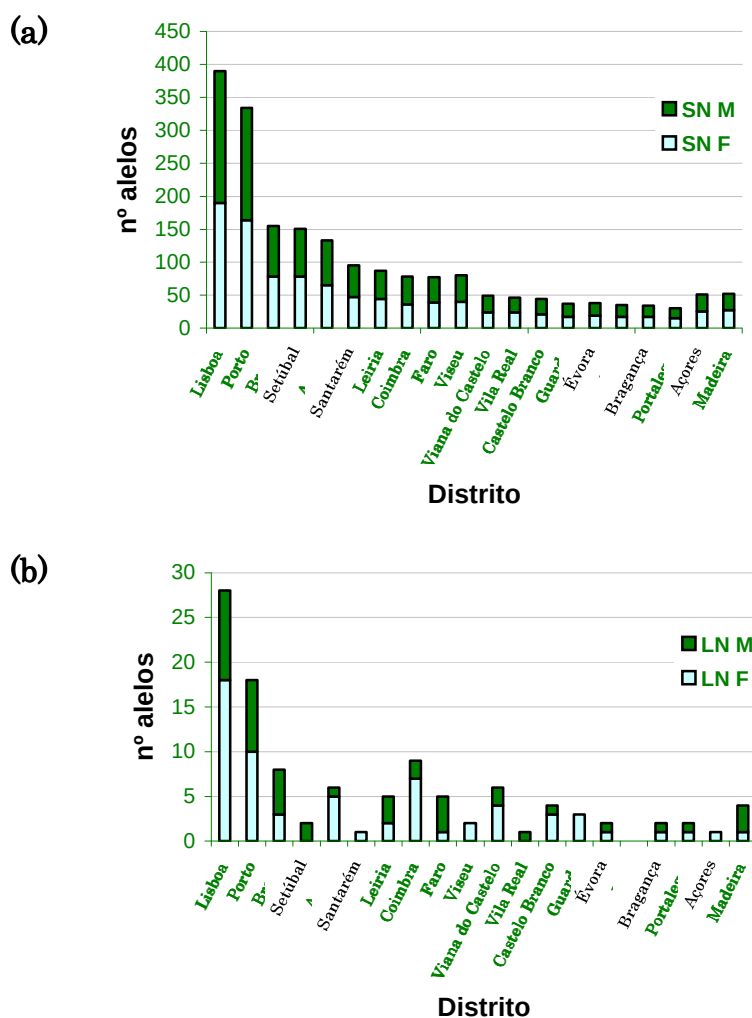


Fig.14. Variação do número de alelos encontrado em cada um dos grupos considerados (SN, LN, PM e Exp) de acordo com o sexo. Indicação da percentagem (%) de alelos do sexo feminino e do sexo masculino no número total de alelos de cada grupo (SN, n=1996; LN, n=109; PM, n=3; Exp, n=10).

Como se pode verificar na Fig.14, os diferentes tipos de alelos não variam muito de acordo com o sexo. As frequências de alelos encontrados do sexo feminino (F) e do sexo masculino (M) são aproximadamente as mesmas para os diferentes casos analisados. Esta observação é ainda mais evidente no grupo de alelos SN (n=1996), no qual cada um dos sexos (F e M) está representado em cerca de 50% da totalidade de alelos encontrados.

Apenas no caso das PM se verificou uma predominância do sexo masculino. No entanto, foram encontrados apenas 3 alelos deste tipo (Fig.12).

Variação dos diferentes tipos de alelos com o sexo nos distritos estudados



Ao observar a variação do número de alelos encontrados para cada um dos tipos de alelos normais (SN- Fig.15 a; LN- Fig.15) de acordo com o sexo, nos 20 distritos estudados, não se observou diferenças, assim como aconteceu com a amostra total (Fig.14).

No grupo de alelos expandidos (Exp) onde foram apenas encontradas 10 expansões (7F e 3M), a divisão por distritos não permitiu a obtenção de número suficiente de amostras para uma observação deste tipo.

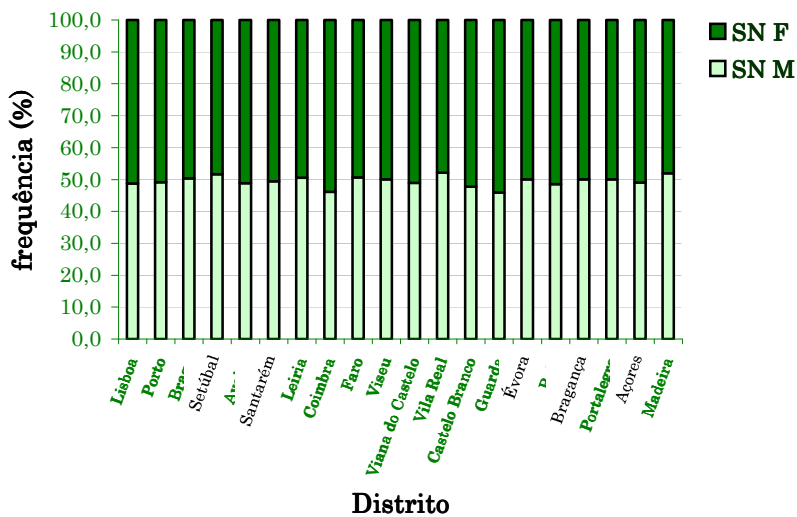


Fig.16. Frequência (%) de alelos do sexo feminino e do sexo masculino no número total de alelos SN encontrados em cada distrito.

Em relação aos alelos normais de pequeno tamanho (SN), foi observada uma percentagem de alelos do sexo feminino e do sexo masculino muito aproximada a 50% em todos os distritos estudados (Fig.16), assim como se verificou na população total (Fig.14).

Alelos expandidos encontrados

Tabela III. Descrição dos alelos expandidos encontrados nos vários distritos. Indicação do número de expansões e tamanho observado (nºGAAs).

Distrito	nº de expansões	tamanho observado (nºGAAs)
Lisboa	2	90 373
Porto	2	623 707
Braga	1	873
Setúbal	1	707
Aveiro	1	940
Coimbra	1	290
Viana do Castelo	1	90
Beja	1	457
TOTAL	10	

Os alelos expandidos foram encontrados em vários distritos, sobretudo nos de maior densidade populacional.

A média dos alelos expandidos foi de 515 GAAs.

A moda, ou seja, os alelos mais representados foram os de 90 GAAs e 707 GAAs.

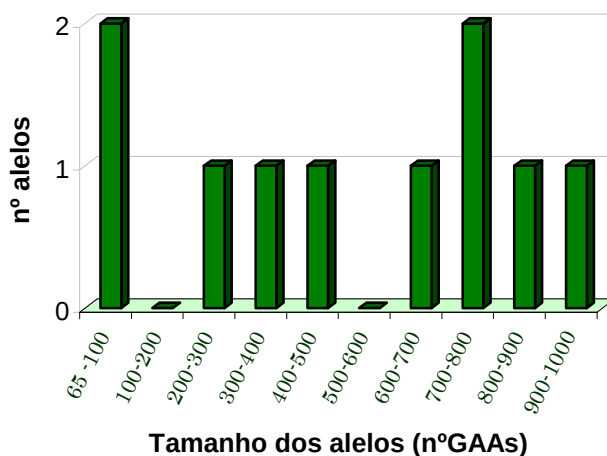


Fig.17. Distribuição das 10 expansões encontradas, de acordo com o tamanho dos alelos (n° GAAs).

A observação da Fig.17 reflecte a moda encontrada neste trabalho e pode ser comparada com a Fig.3, que representa o equivalente na amostra de 180 alelos expandidos, encontrados na população estudada no laboratório do CGPP.

Distribuição geográfica dos alelos patogénicos e pré-mutações

Foi também considerada a distribuição geográfica dos alelos expandidos e das pré-mutações encontrados nos vários distritos, para avaliar a existência ou não, de alguma aglomeração geográfica preferencial desta mutação.



Fig.18. Distribuição geográfica dos alelos expandidos e das pré-mutações, com aparecimento preferencial nos distritos de maior densidade populacional.

Os 10 alelos expandidos encontraram-se aleatoriamente distribuídos pelo país não se tendo verificado uma concentração geográfica especial (tendo em conta a densidade populacional dos distritos).

Duas das pré-mutações foram encontradas na região de Setúbal (Fig.18).

Alelos normais encontrados

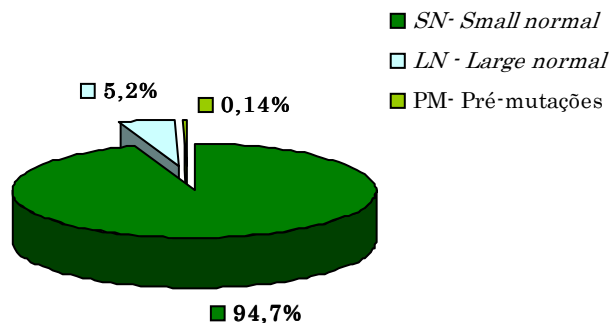


Fig.19. Percentagem dos diferentes tipos de alelos normais (SN, LN e PM) no total de 2108 cromossomas normais estudados.

Entre os alelos de tamanho normal (n=2108) , os alelos de menor tamanho (SN) representavam 94,7%, enquanto os alelos de maior tamanho (LN) apenas 5,2% do total – Fig.19.

As pré-mutações (PM) representavam um total de 0,14% do total de alelos normais observados (2108).

Tabela IV. Alelos normais de elevado tamanho (LN) com mais de 27 GAAs, num total de 2105 cromossomas normais (SN+LN) analisados.

Distrito	Sexo	nº alelos LN >27GAA	Total	% total de alelos normais >27GAAs
Lisboa	F	2	5	0,3
	M	3		
Porto	F	0	1	
	M	1		

Dentro dos alelos normais (excluindo as pré-mutações) foi observado, aqueles que possuíam mais de 27 tripletos repetidos. Apenas 0,3% da totalidade de SN + LN apresentaram um tamanho superior a 27 GAAs (5 alelos com ~28 GAAs e um com ~31 GAAs)- Tabela IV.

Estes alelos normais grandes foram encontrados apenas nos distritos de Lisboa e do Porto.

Dos 6 alelos encontrados com mais de 27 repetições, 4 foram observados em amostras do sexo M e 2 em amostras do sexo F.

Homozigotia/heterozigotia nos alelos normais

Dos 1059 indivíduos testados, apenas 235 (22%) mostraram ser claramente heterozigóticos, conseguindo distinguir-se dois alelos dentro da amplitude normal na primeira análise. As restantes 824 (78%) amostras apresentaram alelos de

tamanho igual ou tão semelhante, que a sua distinção num gel de agarose não foi possível.

Não foi encontrado nenhum homozigoto para uma expansão, nem nenhuma amostra com expansão e uma alelo normal grande.

5.3. Frequência de portadores para a FRDA

A frequência de expansões $(GAA)_n$ causadoras da FRDA, ou seja, 1:212 (10 expansões em 2118 cromossomas estudados) será igual a metade da frequência de portadores, uma vez que não se encontrou nenhum doente (homozigoto).

Foram encontradas 10 expansões em 1059 indivíduos estudados.

- A frequência calculada foi pois de 1:106

6. Discussão

6. Discussão

6.1. A mutação da FRDA na população portuguesa (resultados experimentais)

O conjunto de amostras utilizadas neste trabalho representa, de forma muito aproximada, a população portuguesa. Constituem uma população sem qualquer tipo de enviesamento, com distribuição uniforme por todo o país e correcta representatividade de cada distrito e sexo em relação à população total. Representa a população à nascença, pelo que engloba futuros doentes e não doentes. Desta forma, é uma amostra aleatória, de tamanho significativo, representativa da população portuguesa, validando assim as extrapolações que possam ser feitas.

Dado o intervalo curto em que foram colhidas as amostras para os cartões *Guthrie*, a hipótese de se encontrarem familiares (sobretudo irmãos) fica diminuída, o que torna as amostras mais independentes de relações familiares.

.

Alelos encontrados

Como se pode observar na Fig.12, os alelos normais mais frequentes são os de menor tamanho, com menos de 12 GAAs, o que seria de esperar de acordo com a bibliografia (Bidichandani et al, 2006).

A média do tamanho dos alelos expandidos encontrada foi de 515 GAAs, diferente daquela observada na população de famílias portuguesas estudadas no laboratório do CGPP (secção 1.5). A diferença do número de amostras de expansões em cada um dos grupos é consideravelmente grande (180 alelos expandidos na população estudada no laboratório e apenas 10 expansões na população controlo), o que pode justificar a diferença de valores nas médias encontradas (801GAAs vs 515 GAAs, respectivamente). Seria também de esperar que a amostra de um laboratório de diagnóstico inclua os casos mais graves da população e, portanto, uma média mais elevada para as expansões encontradas.

Na população de famílias afectadas a moda foi de 790 GAAs, variando entre 700 e 900 GAAs os tamanhos mais representados (Fig.3). Com a mesma observação na população controlo foi obtida uma moda de 90 e 707 GAAs, variando os tamanhos dos alelos quase uniformemente entre os 90 e os 1000 GAAs (Fig.17). Mais uma vez, se torna difícil estabelecer

uma comparação entre os dois grupos devido à diferença de tamanho da amostra, assim como obter resultados muito concretos no grupo da população controlo, com apenas 10 alelos expandidos (Tabela III).

Considerando apenas os alelos normais, verificou-se que os alelos grandes (LN) representam apenas 5,2%, enquanto os pequenos (SN) estão representados em 94,7% do total da amostra (Fig.19). Também esta conclusão é suportada pelo já descrito na literatura para as populações caucasianas (Bidichandani et al, 2006). No entanto, os valores encontrados são ligeiramente diferentes dos estimados na bibliografia que considera mais de 80% para os SN e cerca de 15% para os LN. Essa diferença, ainda que pequena, poderá residir, mais uma vez, no facto deste ser um estudo populacional, enquanto que o reportado na bibliografia (Bidichandani et al, 2006) é baseado em estimativas a partir das experiências dos laboratórios que trabalham com a doença.

As pré-mutações (PM) representam 0,14% do total de alelos não patogénicos estudados, o que não difere muito do valor de 1% descrito na literatura internacional (Montermini et al, 1997). Aliás, este é um valor aproximado àquele encontrado na população de famílias, estudada durante os oito anos de diagnóstico molecular da FRDA no laboratório do CGPP (0,19%). A frequência das PM na população controlo foi assim de 1:353 indivíduos.

Num total de 2105 cromossomas normais estudados, foram encontrados apenas 6 alelos (2 F e 4 M) de tamanho normal grande (LN) com mais de 27 GAAs, o que representa 0,3 % da totalidade de alelos normais (SN + LN) – Tabela IV. Este valor parece aceitável, dada a raridade destes tamanhos nos alelos normais (sem considerar as pré-mutações).

Estes alelos normais de elevado tamanho foram encontrados apenas nos distritos de Lisboa (n=5) e do Porto (n=1), o que se pode explicar por serem estes os distritos mais populosos e, portanto, com uma maior probabilidade de encontrar alelos raros.

Variação dos alelos com o sexo

Ao analisar a variação dos diferentes tipos de alelos com o sexo, verifica-se que não há qualquer interferência deste factor no número de alelos e, portanto, nas frequências alélicas, nem na população total (Fig.14), nem quando foram distribuídos por distritos (Fig.15 a, Fig.15 b e Fig.16).

No entanto, quando se analisa as pré-mutações (Fig.14) observa-se claramente uma preponderância do sexo masculino, que não deverá ter qualquer significado, uma vez que foram encontradas apenas 3 alelos deste tipo.

No caso dos alelos expandidos verifica-se uma maioria de expansões em amostras femininas (7F vs 3M), mas o número

a comparar é também ele reduzido, uma vez que só foram encontradas 10 alelos de tamanho patogénico.

De qualquer forma, estas conclusões vêm de encontro ao esperado, uma vez que a ataxia de Friedreich é uma doença genética não relacionada com o sexo, não se esperando *a priori* qualquer variação das frequências alélicas de acordo com este factor demográfico.

Distribuição geográfica

Um outro factor a considerar é a distribuição geográfica dos alelos (Fig.18). Quando se observa a distribuição dos alelos expandidos e das pré-mutações pelos 20 distritos do país, consegue-se verificar uma distribuição com alguma preferência pelo litoral. No entanto, atendendo ao facto de existir uma maior densidade populacional no litoral, e portanto, um maior número de amostras estudadas nestes distritos, facilmente se justifica este achado. A probabilidade de encontrar mutações nos distritos mais populosos é obviamente maior. Para chegar a uma conclusão mais segura, seria necessário aumentar o número de amostras até que houvesse probabilidade de encontrar uma mutação em todos os distritos. De qualquer forma, os distritos mais populosos estariam em vantagem, não significando isso uma aglomeração geográfica preferencial. Pode assim justificar-se

a ausência de mutações observada em alguns dos distritos mais pequenos e nos arquipélagos da Madeira e Açores.

A confirmação desta análise pode ser feita por observação da Tabela III, onde se verifica que os distritos mais populosos correspondem àqueles em que encontrámos mais expansões (duas no Porto e duas em Lisboa). A distribuição dos alelos patogénicos parece pois ser aleatória, afectando mais os distritos com maior densidade populacional (Tabela I).

Quanto às pré-mutações, não é possível tirar conclusões, dado o número reduzido de amostras encontradas.

Detecção de heterozigotos normais

Em 22 % dos casos foi possível excluir, numa primeira fase, a existência de mutação, uma vez que se observou a presença de dois alelos de tamanho visivelmente diferente, dentro da amplitude normal.

A percentagem de amostras com dois alelos normais de tamanho tão próximo que não era possível distingui-los, foi portanto de 78%. Nestes casos, foi necessário continuar o teste das amostras, para se assegurar a não-existência de um alelo expandido (não detectável por este primeiro método laboratorial).

Se observarmos a Fig.8, esta necessidade fica bem representada. No gel podem observar-se 5 amostras heterozigóticas, num total de 30 amostras amplificadas, o que representa 17% de heterozigotia.

Frequência calculada

Quanto ao objectivo principal do projecto experimental, pôde calcular-se a frequência de portadores para a mutação causadora da ataxia de Friedreich como sendo de 1:106 indivíduos (ou seja, uma prevalência de 943:100.000). Este valor enquadra-se nos valores descritos na literatura para as populações caucasianas (1:60 a 1:100) (Bidichandani et al, 2006), ou 1:100 (Brice, 2004; Palau et al, 2006); apenas na Finlândia, onde a doença é bastante mais rara, foi encontrado uma frequência de 1:500 portadores (Juvonen, 2002).

Este é, assim, o valor de referência que passará a ser utilizado para a população portuguesa (aproximadamente 1:100).

A frequência da mutação $(GAA)_n$ estimada é igual a metade da frequência de portadores ($2pq$), ou seja 1: 212, uma vez que não foi encontrado nenhum doente (homozigoto) neste estudo, o que se deve à baixa prevalência desta doença: 2-4:100.000 (Bidichandani et al, 2006).

Pelo princípio de Hardy-Weinberg (Stracham and Read, 2004), sabe-se que o quadrado da frequência do gene (q) indica a frequência da doença em Portugal (q^2). Assim, espera-se que esta seja aproximadamente 1:45.000 (uma prevalência de 2:100.000), valor enquadrado no já descrito pela bibliografia (Bidichandani et al, 2006; Ryan, 2000; Cossé et al, 1997).

A frequência calculada a partir da população de doentes estudados no laboratório do CGPP foi de 0,7:100.000 (correspondendo a 74 doentes até final de 2005), o que se compreende pelo facto de o laboratório não ter acesso a todos os doentes existentes em Portugal, pelo que este valor é pois, subestimado.

Uma vez que a população portuguesa se conta em cerca de 10 milhões de habitantes, e atendendo à frequência da doença calculada (1:45.000), espera-se que existam em Portugal cerca de 222 doentes. Ou seja, aproximadamente um terço dos doentes portugueses terão sido já confirmados molecularmente no nosso laboratório.

Nos 10 portadores da expansão, não foi pesquisada a presença de uma mutação pontual no gene da FRDA, uma vez que não era objectivo deste trabalho. Não podemos assim, tirar qualquer conclusão acerca da presença de heterozigotos compostos na amostra estudada.

6.2. Utilização forense da genética humana

O avanço biotecnológico, nomeadamente na área da genética, permite já a obtenção de DNA a partir de praticamente qualquer material biológico humano. Este avanço torna-se particularmente relevante na área forense para identificação individual. Seria pois possível identificar qualquer indivíduo, em quaisquer circunstâncias se existisse uma base de dados genéticos contendo a informação genética de uma dada população. Estes resultados são como que um código de barras que pertence unicamente a uma pessoa à face da Terra, com a excepção óbvia dos gémeos monozigóticos (Pena, 2002).

Na área forense, esta é uma discussão permanente, com opiniões e discordâncias, fundamentadas em todas as questões éticas que esta problemática levanta.

Em todos os países democráticos, a utilização do DNA em investigação forense restringe-se apenas à parte do DNA não codificante, isto é, que não é informativo de qualquer anomalia ou susceptibilidade genética. Se assim não fosse, poderíamos entrar num mundo perigosíssimo em que a discriminação individual poderia tomar proporções assustadoras ou mesmo, quem sabe, estabelecer-se o tão receado, mito eugénico. Existem, por isso, recomendações, normas e legislação que rege estes procedimentos forenses de

identificação individual (Recomendação N°R (92)1, 1992; Corte Real, 2004).

Claramente, uma fotografia consegue transmitir mais informação acerca do aspecto físico, social e eventualmente mental de um indivíduo, do que propriamente um genótipo forense. Então porque podem ser tiradas fotografias sem consentimento, mas a genotipagem do DNA necessita de um tratamento legal tão especial (Benecke, 2002)? Apesar da utilização de marcadores (STRs – *short tandem repeats* e SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) de DNA não codificante, a genotipagem forense pode não ser tão “inocente” como isso. Ao longo do processo evolutivo desta tecnologia, por exemplo, foram sendo descobertos alguns marcadores localizados cromossomicamente em *loci* muito próximos de genes que codificam para doenças genéticas (Benecke, 2002). Estes marcadores foram, no entanto, sendo abandonados pela sua capacidade informativa, ainda que pequena, para essas disfunções. Apenas para um deles foi encontrada uma forte associação a uma probabilidade aumentada de esquizofrenia (Pena, 2002). Por esse motivo, o marcador genético foi abandonado das pesquisas forenses, mas não podemos assegurar que muitos outros não se encontrem em desequilíbrio de ligação (associação preferencial) com regiões exônicas onde existam genes de susceptibilidade ou ligados a alterações funcionais que ainda não foram descobertos, existindo aqui uma capacidade informativa camuflada. Nestes

casos, quando estes marcadores são detectados, sabemos que há uma probabilidade aumentada de aparecerem ligados a determinados genes codificantes e, portanto, adquirem uma capacidade informativa ou preditiva, que não teriam à partida. Esta constitui uma questão ética importante, pois não pode ser possível perceber um risco aumentado de um indivíduo para qualquer disfunção, quando o objectivo da genotipagem é puramente identificativo. O DNA não codificante a utilizar não deve dar informação sobre o risco potencial de desenvolvimento de uma doença. Não pode ter qualquer valor preditivo. No entanto, esta inocência, considerada até à data bem protegida, poderá desaparecer num futuro bem próximo. Ou seja, o facto de apenas ser analisado o DNA não-codificante, não significa que não se possa obter outro tipo de informação a partir do mesmo.

Uma outra questão a ponderar, é o facto de para obtenção de informação do DNA não-codificante, o procedimento e os materiais serem os mesmos. Uma vez feita a colheita, o material biológico fica disponível para se poderem fazer outros testes. Deverão existir garantias para que esta situação não possa ocorrer. Assim, o material biológico, bem como os resultados obtidos, quer em registo, quer em dados laboratoriais (*raw data*) devem ser destruídos ou então assegurada a total confidencialidade dessa informação. Mesmo que se trate apenas de informação genética não-

codificante, a transposição da barreira do preditivo é muito ténue, e deve ser salvaguardada.

Utilização de informação genética codificante

Na Europa, a legislação proíbe a investigação de genes com um interesse puramente criminal (Benecke, 2002). No entanto, quem poderá negar o interesse da descoberta (se tal for possível) da cor dos olhos, da cor da pele ou do cabelo de um corpo em decomposição ou carbonizado, através da análise genética? O retrato do indivíduo seria uma mais valia na procura da sua identidade.

Será que o teste genético de determinada doença não deveria ser usado para seguir a pista de um violador, de um assassino, ou então de alguém desaparecido, portador dessa anomalia? Irá a sociedade actual resistir à tentação de transpor a barreira do codificante e examinar os genes das amostras biológicas, ou mesmo dos supostos criminosos?

Um aspecto tentador na análise genética, seria mesmo a possibilidade de utilização da informação genética de doenças hereditárias, como auxiliar da medicina forense na resolução de casos criminais. Por vezes, poderia ser bastante útil a pesquisa de algumas doenças ou condições hereditárias, em amostras deixadas no local do crime, o que com certeza diminuiria bastante o grupo inicial de suspeitos caso fosse

descoberta alguma doença ou susceptibilidade em particular. Mais ainda, comprovar a culpa de um suspeito por análise de uma doença genética em particular num vestígio de modo a fazê-lo corresponder a esse indivíduo, pode facilitar o processo.

Utilização da medicina preditiva

Claro que se está apenas a considerar casos em que a presença de determinada mutação é causadora de uma doença já manifesta, e não o caso dos indivíduos ainda assintomáticos, onde este tipo de pesquisa não ajudaria a investigação em nada (ou em muito pouco), a não ser que fosse possível ter acesso à informação preditiva de indivíduos com doenças familiares já confirmadas. Considerando esta última situação, quando após um rastreio de algumas doenças genéticas num vestígio biológico (na tentativa de diminuir o grupo de suspeitos), se encontra alguma informação que se possa associar a determinado indivíduo pela sua história familiar, embora ele seja ainda assintomático, obter-se informação preditiva desse indivíduo (se já realizou um teste pré-sintomático ou de portador) poderia não ser muito abusivo, dado este já ter conhecimento da sua condição genética. No entanto, ficariam outros a saber. Esta seria a única e possível forma de utilização da medicina preditiva na resolução de casos criminais.

Por outro lado, impor a indivíduos assintomáticos tomar conhecimento de uma alteração genética, que no futuro poderá ditar o aparecimento de uma doença, que desconhecem até ao momento, é inconcebível e, aliás, proibido pela lei portuguesa (Lei nº 12/2005, artº 17º, nº 2) .

A grande questão, mais uma vez, que faz com que um teste pré-sintomático com a finalidade de associação de um suspeito a determinado vestígio não possa ser utilizado como forma de investigação forense, é a sua implicação no estado de saúde futura do indivíduo.

Utilização da genética médica

À partida, a utilização forense de variantes genéticas com implicações na saúde actual da pessoa, poderá parecer um campo muito perigoso e até abusivo. No entanto, são já utilizadas técnicas que permitem, por exemplo, detectar numa amostra deixada no local do crime, se o indivíduo é ou não diabético, com o objectivo de restringir o leque de suspeitos (Benecke, 2002). Em que termos poderá ser avaliada a gravidade da doença que se vai testar e quais as suas implicações para o indivíduo? Para a pessoa testada será sempre uma utilização do seu estado de saúde (ou de uma outra condição genética em particular) para a resolução de um caso criminal.

Quem está a ser analisado poderá achar muito útil essa utilização (dando à partida o seu consentimento), se estiver no papel de vítima para quem essa análise poderá ser benéfica. Se, pelo contrário, se tratar do suspeito de um crime, em que essa mesma análise o poderá incriminar, é óbvio que não consentiria essa utilização, a qual seria abusiva da sua privacidade individual.

No entanto, uma possível utilização da genética médica em questões forenses não pode ser ponderada de forma distinta conforme se trate de vítima ou de suspeito. Deverá haver uma posição uniforme, que considere os benefícios possíveis do processo, mas sem nunca prejudicar os princípios básicos dos direitos e liberdades individuais.

Poderemos questionar-nos se as leis das nossas democracias nos garantem a prevenção contra os abusos (ou não) desta informação. Esta transposição da barreira do codificante, abusiva ou não, poderá acontecer um dia, pois nem a pesquisa científica e forense parará, nem as pessoas pararão de cometer crimes (Benecke, 2002).

6.3. Medicina preditiva

Nesta fase, passaremos a reflectir na tipagem do DNA codificante (genes) e nas suas implicações éticas e legais, as

quais estarão eventualmente ligadas à discriminação face ao património genético, à perda de autonomia e quebra da confidencialidade e privacidade, ao armazenamento de amostras biológicas em biobancos que constituem no fundo autênticas bases de dados genéticos e à protecção necessária desses mesmos dados.

As bases de dados genéticos com interesse criminal não são ainda permitidas no nosso país (Corte Real, 2004), embora representem um tema de discussão bastante actual. Por despacho do Ministro da Justiça (Despacho nº 2584/2006) foi criada uma comissão com a incumbência de proceder à elaboração de uma proposta de constituição e funcionamento de uma base de dados genéticos para fins de identificação civil e de investigação criminal, a qual deverá ser discutida no parlamento em 2007.

Apesar disto, as amostras biológicas continuam a existir em grandes biobancos populacionais, os quais constituem uma potencial fonte de informação genética a qualquer momento. Algumas instituições possuem um conjunto de amostras biológicas (sangue, DNA, células em cultura) utilizadas na investigação ou diagnóstico de doenças, as quais são armazenadas em biobancos durante períodos prolongados ou mesmo ilimitados. Um exemplo deste tipo de biobancos, consiste no armazenamento de sangue seco em papel, resultante do rastreio neonatal da fenilcetonúria e do hipotiroidismo congénito, o qual compreende amostras de

quase toda a população portuguesa, funcionando também ele como fonte de DNA dessas amostras durante todo o período de armazenamento, ou seja, ilimitadamente.

A medicina preditiva tem um valor importantíssimo em termos de saúde pública, ajudando a prevenir doenças hereditárias que afectam várias famílias, cuja vida se pode alterar drasticamente de um momento para o outro, e as quais precisam de um acompanhamento profissional das equipas multidisciplinares envolvidas nesta área.

Devido às suas extremas potencialidades, a medicina preditiva torna-se de importância crucial para outras áreas, com um interesse especial em aspectos que nada têm a ver com a saúde dos indivíduos. As seguradoras, as entidades empregadoras e entidades com um qualquer envolvimento contratual, surgem como os principais interessados na possibilidade de prever situações futuras com base na informação genética, mas com o único propósito de realizar um bom negócio, ou de obter mais valias para si próprias.

É pois necessária uma atenção cuidada e grande ponderação acerca das potencialidades da medicina preditiva, promovendo a discussão ética e legal de todas as suas implicações e consequente regulamentação, de forma a evitar abusos. Entre eles, poderão enquadrar-se a possibilidade de discriminação face às características genéticas dos indivíduos, a possibilidade de armazenamento não consentido de

amostras para utilizações diversas e a utilização abusiva da informação genética para fins não médicos.

Uma outra questão levantada pela utilização da medicina preditiva, está relacionada com a liberdade das pessoas tomarem conhecimento de uma alteração genética que apenas poderá ter consequências no futuro. Nas várias discussões éticas que este tema suscita, um argumento importante em todas elas, e que deve ser sempre considerado, é o direito de todas as pessoas poderem recusar a realização de testes genéticos no âmbito da medicina preditiva.

O direito de conhecer ou não os resultados

Nos exames genéticos, sobretudo nos preditivos, o conhecimento dos respectivos resultados pode limitar a autonomia do indivíduo. No caso das doenças monogénicas, o facto de um indivíduo vir a saber que é portador de um gene mutante pode alterar completamente o seu projecto de vida, mesmo que a manifestação da doença esteja prevista para uma fase tardia da sua vida. Nesta situação, o indivíduo tem toda a legitimidade em recusar tomar conhecimento dos resultados (Lesseps dos Reis, 1999). Também no caso de testes de portador, como na FRDA, a descoberta de uma mutação em heterozigotia poderá ter consequências similares, embora sentidas de forma diferente, uma vez que neste caso não

implica consequências para a saúde do próprio mas sim para a sua descendência.

O direito dos indivíduos não serem informados acerca dos resultados dos seus testes genéticos, encontra-se estritamente associado a direitos fundamentais, nomeadamente o direito à integridade física e moral, o direito à liberdade, o direito à identidade pessoal e o direito à reserva da intimidade da vida privada e familiar (Pereira de Melo, 1997). Assim, este direito aparece salvaguardado pela lei actual, que refere que todo o cidadão tem direito a recusar-se a efectuar um teste genético pré-sintomático, de heterozigotia e pré-natal, ou a receber aconselhamento genético e acompanhamento psicossocial antes e depois da realização dos mesmos (Lei nº 12/2005, artº 17º, nº 2 e nº 3).

O médico requisitante dos exames genéticos deve garantir a confidencialidade dos exames, não só em relação ao próprio indivíduo testado, mas também aos seus familiares que não o foram, e cujo risco ficou assim modificado.

Se, for vontade da pessoa conhecer os resultados de um teste genético, compete então ao médico prosseguir com o protocolo transmitindo-os no momento apropriado. A situação torna-se mais complexa quando um gene alterado corresponde apenas a uma susceptibilidade aumentada para determinada patologia, cuja expressão fenotípica está ainda sujeita à influência de outros factores, por vezes desconhecidos ou

incontroláveis. O resultado nesse caso implica apenas uma modificação de um risco relativo (em relação à população em geral).

O direito dos indivíduos conhecerem o seu património genético não é ilimitado, principalmente no caso da medicina preditiva, pelo que a sua autonomia não pode prevalecer sempre sobre a vontade do médico, nem obrigá-lo a cometer um acto que este considere contrário às *leges artis* (Pereira de Melo, 1997). Por exemplo, caso o médico considere que o indivíduo não apresenta condições psicológicas para tomar conhecimento de um resultado que poderá ter um impacto muito forte com consequências imprevisíveis, não deverá continuar com o processo de teste (Lesseps dos Reis, 1999). O médico geneticista desempenha um papel fundamental na decisão de efectuar o teste pré-sintomático, sobretudo nas doenças genéticas de manifestação tardia, competindo-lhe ponderar os previsíveis riscos e benefícios e definir qual a intervenção mais adequada em cada caso (De Wert, 2005).

O dever de informar os familiares

No aconselhamento genético destas famílias outras questões se levantam. Deverão os portadores avisar os restantes familiares directos que possam também ter a mesma alteração no seu gene? É esse o seu dever, ou será o de se protegerem a eles próprios da possível discriminação a que

poderão estar sujeitos? Claro que esta questão se coloca sobretudo nos portadores de doenças dominantes após realização de teste pré-sintomático e eventualmente após uma confirmação molecular de diagnóstico. No caso de testes de heterozigotia, o medo da discriminação não surge tão evidenciado pelo que a comunicação aos familiares surge de forma natural e protectora.

E qual o papel do médico geneticista que segue estas famílias? Deve o médico focar-se no objectivo da erradicação da doença ou prender-se ao sigilo profissional, nomeadamente ao dever de confidencialidade extrema que impõe a informação genética? Estas são questões difíceis de responder, devido ao impacto psicossocial que a descoberta destas alterações genéticas podem ter para os indivíduos, mesmo que simples portadores para doenças recessivas (nunca desenvolvendo a doença), como é o caso da FRDA.

Um resultado positivo de um teste de portador (para doenças dominantes e recessivas) pode ser de enorme importância para outros membros da família, competindo à pessoa testada comunicar o resultado aos familiares que clinicamente necessitem dessa informação. Se a pessoa recusa, o médico pode ver-se perante o dilema de ir contra o segredo profissional e a autonomia do seu doente, ou contra o princípio da beneficência em relação às pessoas em risco, que podem precisar da sua ajuda e dessa informação. De forma a ultrapassar esta situação, é necessário que o médico explique

convenientemente ao indivíduo testado a importância da divulgação dos resultados aos familiares envolvidos, intercedendo nesse sentido (De Wert, 2005). No caso de não conseguir, a tendência actualmente predominante parece ser a de considerar que o sigilo profissional não é absoluto e que a sua obrigação pode cessar perante graves interesses de terceiros, neste caso, os familiares implicados (Archer, 1998). Mas, essa transmissão de informação deve restringir-se ao mínimo indispensável (Godard et al, 2003). Segundo a recomendação N°R(92)3 do Conselho de Ministros, a comunicação de resultados aos familiares da pessoa testada, caso este recuse informá-los, deve ser feita apenas por autorização judicial, mesmo que a vida destes esteja em perigo.

Ponderando estas situações, ressalta a extrema importância de um correcto aconselhamento genético, o qual se deve regular pelas boas práticas profissionais e se encontra regulamentado na nossa legislação (Lei nº 12/2005), que obriga a que qualquer teste de heterozigotia ou pré-sintomático em pessoas saudáveis só possa ser executado com autorização escrita do próprio, e a pedido de um médico com a especialidade de genética na sequência da realização de consulta de aconselhamento genético.

Esta e outras determinações aparecem de forma a melhor salvaguardar o princípio da não discriminação.

6.4. Discriminação face ao património genético

Apesar da sua inegável importância na prevenção de doenças genéticas, os testes de heterozigotia realizados nas famílias de doentes FRDA (assim como noutros tipos de testes e noutras doenças genéticas) levantam várias questões éticas, entre as quais a possível discriminação em face do património genético, a autonomia, a beneficência e maleficência, o direito à privacidade e confidencialidade individuais.

Além da informação obtida pelos testes genéticos realizados voluntariamente pelo indivíduo em contexto médico, poderão ocorrer no futuro situações em que esta informação pode ser usada por terceiros, num âmbito jurídico. Conforme referido anteriormente, diversas empresas, tais como companhias de seguros, entidades empregadoras e agências de adopção, podem procurar obter acesso privilegiado a essa informação para minorarem os seus riscos ou determinarem procedimentos economicamente mais rentáveis. O problema decorrente consiste em avaliar o interesse dos testes genéticos como preliminar de certos negócios jurídicos e se será lícita a sua utilização nesses casos.

No casamento

O casamento surge geralmente associado à procriação. Não admira que qualquer Estado pretenda usar o momento da celebração do casamento para estimular o conhecimento de condições genéticas dos dois nubentes, quer no interesse dos próprios, quer no interesse da descendência.

Existe legislação em outros países, nomeadamente em França e em Chipre, onde é obrigatório a apresentação de um atestado médico, em termos de saúde pública, referente a “afecções contagiosas ou crónicas susceptíveis de ter consequências perigosas para o cônjuge ou para a descendência” (Oliveira, 1996/1997). Considerando este facto, o passo entre as doenças contagiosas e as doenças hereditárias é fácil e natural, numa época de grande evolução da genética.

Em Chipre conseguiu-se, com o rastreio pré-nupcial, o resultado fantástico de diminuir dez vezes, em aproximadamente três anos, o número de crianças nascidas com uma forma grave, autossómica recessiva, da talassémia, muito frequente na sua população, onde uma em cada sete pessoas é portadora heterozigótica da mutação. Desta forma, conseguiram com que a incidência ao nascimento diminuísse de 1 em cada 158, para 1 em cada 1000 (Angastiniotis, 1990). O mesmo poderia acontecer com a FRDA, também uma doença

recessiva, para a qual um rastreio deste tipo poderia ser benéfico na diminuição da sua prevalência.

Em França, o Conselho Nacional de Ética, admitiu já que o exame pré-nupcial poderia ser ampliado de modo a incluir a despistagem de riscos genéticos, como forma de adaptação à realidade clínica moderna (Oliveira, 1996/1997). São exemplos, doenças com prevalência elevada na população em geral, ou mesmo em grupos ou regiões particulares.

No entanto, o quadro legal português é ainda desfavorável no que respeita a um controlo médico pré-nupcial. A Constituição Portuguesa de 1976, no seu princípio da “liberdade para contrair casamento em condições de plena igualdade” (artº 36º, nº1), levanta dúvidas quanto à constitucionalidade destes impedimentos, uma vez que não se baseiam em interesses públicos dignos de tutela. No nosso sistema jurídico, os obstáculos ao casamento apenas podem basear-se em nítidos interesses públicos (Oliveira, 1996/1997). Isto não quer dizer que, com o evoluir de conhecimentos acerca das doenças genéticas, daqui a alguns anos não venha a ser necessário, por um claro interesse público, a prevenção pré-nupcial de qualquer doença hereditária, mesmo que o rastreio seja limitado a determinadas regiões em que a doença seja mais frequente. Não se pode é confundir prevenção da doença com eugenismo e fazer uma selecção genética sem interesses legítimos devidamente fundamentados.

Neste âmbito, um outro problema se levanta. Terá um nubente o direito à confidencialidade dos resultados dos testes ou o dever de os comunicar ao outro membro do casal, sempre que tenha conhecimento de algum defeito genético grave, mesmo que o sistema jurídico não estabeleça qualquer necessidade de exame pré-nupcial? Seguramente, que o direito à confidencialidade está assegurado, mas este é um caso em que os descendentes poderão vir a ser afectados e o princípio da beneficência deveria prevalecer. No entanto, neste caso, compete exclusivamente ao portador o bom senso de comunicar os resultados e, juntamente com o outro membro do casal, continuar o processo de aconselhamento genético.

A possibilidade de rastreios pré-nupciais obrigatórios consiste, pois, numa questão de importante ponderação como forma de diminuir a prevalência de doenças genéticas. Devido à sua importância para a sociedade em geral, e desde que devidamente fundamentado e demonstrada a sua eficácia, facilmente os seus benefícios superarão as questões éticas citadas, conseguindo a cobertura legal necessária.

Na adoção, perfilhação e regulação do exercício do poder paternal

Outras situações de possível discriminação surgem quando se pensa na adoção, na perfilhação ou na regulação do exercício do poder paternal.

O quadro legal em que se desenrola o processo de adoção prevê expressamente a realização de um inquérito sobre a saúde do adoptando (artº 63º da Organização Tutelar de Menores, OTM). Este inquérito serve para ponderar melhor as necessidades da criança e as capacidades de certa família adoptiva satisfazer essas necessidades, o que se revela de extrema importância no sucesso da adoção (Oliveira, 1996/1997). É obvio que o exame previsto é necessário e conveniente e não pode ser recusada, em princípio, uma decisão informada por parte da família adoptante. Mas, será que esses inquéritos devem incluir exames de carácter genético? À partida parece haver boas razões para os excluir. Quando se pensa numa doença recessiva, a criança pode apenas ser portadora de um gene defeituoso sem nunca desenvolver a doença, podendo apenas colaborar na sua transmissão aos seus próprios descendentes, como no caso da FRDA. Esta circunstância torna-se, pois, irrelevante no momento da adoção, pelo que não deve ser averiguada. No caso de doenças genéticas dominantes, com as quais a criança

possa vir a ser afectada mais tarde, e principalmente quando não existe qualquer tipo de cura ou tratamento, a lei é bem clara em proibir os testes pré-sintomáticos a menores (Lei nº 12/2005, artº 17º, nº5). Quando atingirem a maioridade decidirão conhecer ou não o seu estatuto genético.

Neste caso concreto, um interesse particular dos adoptantes em escolher uma criança com mais esperança de vida saudável seria indigno de tutela jurídica.

Considerando agora a posição dos candidatos a adoptantes, são conhecidos casos de exclusão de candidatos que reuniam todas as condições tradicionais, com base apenas em testes genéticos, nomeadamente para a doença de Huntington (Billings, 1992). Esta exclusão pode ignorar a capacidade de desempenhar o papel como adoptante durante muito tempo. No entanto, se a doença for realmente grave e se se prevê que o papel de adoptante não poderá ser executado por completo, então a criança pode ser prejudicada. Deverá ser avaliado o melhor interesse para a criança, mas não pode ser esquecido que se está a discriminar alguém, que a quer adoptar, só pelo seu estatuto genético sem nenhum fundamento de diminuição da sua capacidade física ou psicológica actual. A lei portuguesa proíbe sem excepções a realização de testes genéticos ou utilização de informação genética anteriormente obtida, quer pelos candidatos a adoptantes quer pelas agências de adopção (Lei nº 12/2005, artº 14º).

Um outro caso que também terá que ser considerado, consiste na adopção de uma criança com o objectivo principal de se conseguir um futuro cuidador, quando se realizou já um teste pré-sintomático, antecipando a possibilidade da doença. Neste último caso, a exclusão do adoptante basear-se-ia apenas em aspectos psicológicos e não físicos ou genéticos. Não seriam as suas características genéticas nem o seu estado de saúde, futuramente ameaçado, que colocariam em causa a sua capacidade de adoptar uma criança, mas sim os seus objectivos actuais que não o tornam merecedor de tal confiança e responsabilidade.

Ao contrário da adopção, que representa um vínculo familiar sem suporte biológico, a perfilhação tende para o reconhecimento jurídico de um vínculo biológico pré-existente, cuja existência e relevância jurídica não estão sujeitas a ponderação pelos interessados ou pelo tribunal. Aliás, o progenitor tem o dever jurídico de o praticar (Código Civil, artº 1864º e 1865º) (Pinheiro, 2002). Um inquérito sobre a saúde do perfilhando, nomeadamente um exame de carácter genético, só seria concebível num sistema jurídico que entendesse a perfilhação como acto facultativo, o que não acontece em Portugal.

Em situações de divórcio, de separação judicial ou de facto, ou em processos de inibição e limitação do poder paternal, começa também a falar-se na possibilidade de utilizar os conhecimentos das predisposições genéticas no juízo sobre a

regulação do poder paternal. Nestes casos, está previsto na lei que se usem relatórios médicos e psicológicos pelo que poderão tornar-se lícitos os exames genéticos, sem que para tal seja necessário uma intervenção normativa ou judicial, mas sempre aplicando o critério do “interesse do menor” (Oliveira, 1996/1997). No caso de a doença de um dos progenitores já se tiver manifestado, um exame genético diagnóstico, poderá confirmar uma situação de saúde diminuída, que poderá não ser a melhor condição para o exercício do poder paternal. No entanto, no caso de indivíduos assintomáticos, não faz qualquer sentido realizar testes pré-sintomáticos de várias doenças ou rastrear predisposições genéticas sem qualquer fundamento. A questão só se coloca, quando estiverem em causa doenças familiares já confirmadas, ou alterações genéticas associadas a determinados grupos ou regiões geográficas. Apenas nestes casos poderá fazer algum sentido a realização de um teste pré-sintomático. Contudo, não devemos esquecer que o indivíduo em causa não pode ser obrigado a tomar conhecimento de uma possível alteração genética, se assim não entender. Será que neste caso, o interesse do menor poderá ultrapassar o direito à liberdade individual de conhecer o resultado de um teste preditivo que poderá, ou não, ter influência no seu estado de saúde futuro? Não parece muito lícito. E mais uma vez se retorna à questão já colocada no caso de adopção, ou seja, um resultado pré-sintomático actual não deverá incapacitar uma pessoa de exercer o poder paternal, que pode fazê-lo durante um longo período de forma

saudável. No caso dos testes de portador para doenças recessivas, como seria o caso da FRDA, a questão nem se coloca, uma vez que as consequências em termos de saúde, se restringem à descendência.

Em todas as situações referidas anteriormente, a questão base a considerar na utilização dos testes genéticos, consiste nas diferenças éticas colocadas pela medicina genética diagnóstica e pela medicina preditiva, na qual a utilização da informação genética é ainda mais problemática dado o seu carácter preditivo e futuro, que faz com que tenhamos uma visão diferente em cada um dos casos.

Pela entidade empregadora

No contexto dos contratos de trabalho, a utilização de testes genéticos com a pura finalidade de um benefício para a entidade empregadora surge como um acto discriminatório com grande relevância.

Os empregadores poderiam usar a informação genética para evitar a contratação de trabalhadores que eles acreditem ser propensos para determinadas doenças, e por isso venham a ter mais ausências por doença, reforma antecipada ou qualquer problema de saúde que afecte a sua produtividade. Assim, a predisposição genética pode conduzir a discriminações no local de trabalho, ainda que não haja

qualquer manifestação da doença ou que a probabilidade desta vir a ocorrer seja reduzida, ou mesmo que a condição genética não tenha qualquer efeito na capacidade de realização da tarefa em causa. À medida que a investigação genética avança e os custos dos testes diminuem, é provável que aumente o incentivo económico de discriminar com base na informação genética.

A única justificação que pode sustentar o propósito dos empregadores será a defesa do trabalhador pelo despiste de trabalhadores hipersensíveis a certos factores laborais, que por propensões especiais possam por em perigo a sua vida e integridade física, bem como a de terceiros (Oliveira, 1996/1997). Contudo, não é frequente que uma predisposição genética se manifeste ou acelere a sua expressão por causa de certo agente presente no local de trabalho. Essa manifestação poderá mesmo não ocorrer ou ficar a dever-se a outros factores ambientais, estranhos a esse local. Com esta visão, as alegações das entidades empregadoras são muito frágeis.

Não se pode condenar ao desemprego um indivíduo ainda saudável e que pode sê-lo para sempre, na tentativa de proteger uma saúde apenas ameaçada. Assim, não se deve excluir a contribuição produtiva de um indivíduo com base na convicção de que ele, um dia mais tarde, virá a pesar na economia do país, nem usar estes rastreios genéticos para baixar custos de empresas. Negar trabalho por razões, não de incapacidade, mas de predição de doenças futuras ou meras

predisposições, representa uma forte estigmatização (Oliveira, 1996/1997).

A exclusão de pessoas das oportunidades de trabalho com base em testes genéticos só parece eticamente aceitável quando se prove ser absolutamente necessário para a saúde do trabalhador ou para a segurança de terceiros. Um bom exemplo desta situação será o caso dos pilotos de avião (Archer, 1998). A detecção precoce de riscos profissionais devido a predisposições inatas poderá eventualmente ser útil na medicina ocupacional, que assim pode estabelecer as medidas preventivas adequadas (Lesseps dos Reis, 1999). Mesmo assim, esta situação deverá ser alvo de uma cuidada ponderação de forma a defender os direitos dos trabalhadores (potenciais ou efectivos) do mesmo modo que se defende o direito da sociedade à segurança.

Vários países Europeus, como a França, Suécia, Finlândia, Dinamarca, Áustria, Itália e, agora mais recentemente, Portugal, desenvolveram legislação e recomendações internas que visam a protecção dos trabalhadores prospectivos ou não, face à pressão discriminatória exercida cada vez mais pelas entidades empregadoras. No entanto, um grupo de trabalho da Comissão Europeia referiu no seu relatório sobre os aspectos éticos dos testes genéticos no local de trabalho que os trabalhadores ainda não estavam suficientemente protegidos dada a possibilidade das entidades empregadoras poderem usar um termo de consentimento para a realização desses

testes (*Group on Ethics in Science and new Technologies to the European Comission*, 2003). É de realçar que esse consentimento, poderá ser dado pelos trabalhadores em condições de extrema pressão face à necessidade de um emprego, pelo que o poder abusivo das empresas empregadoras deverá ser contido. A lei portuguesa prevê já esta situação, proibindo a realização de testes genéticos ou divulgação de resultados previamente obtidos, mesmo com o consentimento do trabalhador (Lei nº 12/2005, artº 13º, nº2).

Pelas companhias de seguros

Um outro tema de discussão que surge no topo da lista das possíveis discriminações em face do conhecimento do património genético dos indivíduos, consiste na capacidade de prognóstico dos exames genéticos, que os tornam adequados aos objectivos das companhias de seguros. As seguradoras poderiam assim requerer testes genéticos individuais e condicionar as suas apólices de seguro.

Será então legal que uma seguradora calcule o risco do seu cliente, ou seja, a estimativa de vida e de morte ou de doença, com base num questionário médico que inclua doenças de transmissão hereditária de confirmação laboratorial? Será legítimo que um indivíduo pague mais por um risco alheio à sua vontade e controlo? A utilização da informação genética pelas seguradoras poderá levar a discriminação e abuso da

liberdade de escolha, pela negação ou aumento de custo de um serviço que não pode ser praticado por outra organização (Oliveira, 1996/1997). Esta questão tem vindo a aumentar de importância devido ao aumento da procura de seguros de vida, necessários na maioria das circunstâncias para a obtenção de crédito à aquisição de habitação própria, e ainda de seguros de saúde em complementaridade aos serviços de saúde públicos.

As companhias seguradoras precisam avaliar os riscos que seguram para fixarem os prémios, de tal modo que possam distribuir os custos por todos os segurados, garantir a capacidade financeira da empresa e conseguir lucro. O que não podem é eliminar o fundamento da sua actividade, ou seja, o risco, e assim excluir da sua carteira de clientes os casos que considerem prejudiciais.

Sob o ponto de vista estatístico, as doenças e mortes por causas genéticas sempre foram consideradas nos cálculos dos prémios atribuídos aos segurados. Apesar deste facto, o que está em questão actualmente é a possibilidade de tratar desfavoravelmente os indivíduos que provavelmente vão constituir um mau negócio (Fisher, 2004).

Tentando agora observar o outro lado, não se pode afastar o dever que os candidatos a segurados têm de revelar o que souberem acerca do seu estado de saúde. Aliás, o dever de informação é basilar num contrato de seguro, que pode mesmo

tornar-se inválido pelo não cumprimento desse dever (artº 429º do Código Comercial). Este dever de informação é necessário para garantir a boa-fé na organização social de cobertura de riscos. No entanto, constitui uma restrição do direito fundamental à reserva da vida privada e, portanto, deve reduzir-se ao mínimo indispensável. É defendido que a solução para este conflito de interesses, deverá ser a de dar precedência aos interesses do segurando (Oliveira, 1996/1997; Archer, 1998). Será sempre um regime restritivo para as seguradoras.

Independentemente da situação de equilíbrio que deve encontrar-se, parece razoável excluir-se liminarmente que uma companhia de seguros possa exigir a pesquisa de doenças genéticas mortais e incuráveis, de doenças não mortais mas que sejam graves e sem terapêutica conhecida e mesmo aquelas com terapêutica conhecida, para as quais pode ser previsto o custo do tratamento (Goldberg, 2001). Os interesses económicos das empresas não podem levar um candidato a tomar consciência de uma predisposição para uma doença grave ou fatal, que ele não conhecia nem pode evitar com os meios científicos disponíveis (*Comitte on Genetic Testing/Insurance Issues*, ASHG, 1995).

Mas, se se considerar a hipótese de que os indivíduos afectados possam usar vulgarmente as novas técnicas genéticas para conhecer o seu futuro e fazer os seguros mais convenientes? Neste caso, não parece justo recusar às

seguradoras as mesmas armas para formular o cálculo do risco. Mas nada está legislado neste aspecto. Tem mesmo que se confiar na boa fé dos segurados.

No entanto, não seria correcto poder utilizar a informação de um teste preditivo para provar a má-fé do segurado ao realizar o contrato de seguro? Será que a prova forense da má intenção do indivíduo sabedor do seu estatuto genético desfavorável, não deverá prevalecer sobre o direito à confidencialidade, como forma mais justa de intervir numa questão como esta? Num processo judicial, poderá o laboratório ou o médico, possuidores do resultado do teste genético preditivo, divulgar essa informação como prova da má intenção do segurado ao realizar o seguro monetariamente mais conveniente? Apesar das evidências para uma resolução mais justa, o laboratório ou o médico não têm consentimento para divulgar o resultado que só ao consultando pertence, nem tão pouco confirmar a sua existência, pelo que neste caso o papel da medicina preditiva na resolução deste caso forense poderá estar limitado. Apesar disto, poderá ser ponderada pelo tribunal a resolução deste conflito de interesses, fazendo prevalecer a má intenção do segurado sobre o seu direito à privacidade (que fica anulado pela sua atitude incorrecta), perante a realização de um contrato, com a anulação do mesmo. A questão estará na intervenção da medicina preditiva como meio de prova, e se o laboratório que realizou o teste preditivo poderá intervir nesta questão, ainda que por

imposição jurídica. A lei portuguesa actual, proíbe as companhias de seguros de obter qualquer informação genética para recusar um seguro ou estabelecer prémios mais elevados (artº 12º), quer no que se refere a novos testes (artº 12º, nº2), quer a testes previamente realizados (artº 12º, nº3). Recusa ainda a possibilidade de utilização de registos dos antecedentes familiares (artº 12º, nº4). No que diz respeito à intervenção do tribunal, de forma a que o conhecimento prévio dos segurados sobre as suas características genéticas e consequente estado de saúde futuro, possa constituir meio de prova da sua má intenção na realização do seguro, a lei é omissa. Torna-se claro, que o laboratório não deve de forma alguma revelar a informação em sua posse, mesmo que tome conhecimento de uma situação como esta. No entanto, pode não ser descabido que, por intervenção judicial, possa ser averiguado o conhecimento prévio de determinado segurado sobre a sua condição genética quando realizou o seguro mais conveniente para ele, imposição essa que deverá estar muito bem fundamentada.

Nos empréstimos bancários

Tem sido recorrente a pretensão de prever o futuro dos indivíduos através de testes genéticos em contratos que se prolongam no tempo, designadamente em empréstimos bancários. Esta previsão destinar-se-ia a seleccionar os

contraentes do empréstimo, por forma a admitir apenas os que dessem a máxima garantia de permanecerem vivos e activos durante o prazo de pagamento, normalmente bastante alargado. Estes interesses não devem permanecer sobre a defesa da reserva da intimidade dos candidatos. A entidade bancária está já protegida pela garantia da hipoteca que recai sobre o imóvel ou bem, para além da garantia geral do património do devedor.

Na atribuição de prestações sociais

Até agora foi considerada a possível discriminação pelo sector privado (excepto no caso das instituições de adopção). Consideremos agora, que a questão se pode colocar no sector público.

Noutros países, tal como a França e os Estados Unidos da América, não é raro que se imponha aos cidadãos a submissão a certos exames médicos, como requisito de atribuição de prestações sociais (Oliveira, 1996/1997). O mesmo poderia, acontecer em relação a certos exames genéticos, como por exemplo a realização de diagnóstico pré-natal em grávidas com mais de trinta e cinco anos, como condição dos benefícios sociais de apoio a crianças com trissomia 21. A realização de certos exames pode, em alguns casos, evitar males maiores que trariam ao estado despesas consideravelmente mais avultadas. Nesta situação podem encontrar-se outras doenças

genéticas muito frequentes em determinados grupos, doenças genéticas já confirmadas nos progenitores ou doenças recessivas cuja frequência de portadores possa justificar um rastreio aos pais, com possibilidade de DPN posterior caso haja necessidade.

Como já foi referido para a FRDA, este tipo de rastreio nos progenitores só será justificado por uma frequência elevada da mutação, mas na tentativa de diminuir a prevalência da doença e não de diminuir despesas futuras do Estado. Deve ser ressalvada a liberdade de escolha dos progenitores, quererem ou não, realizar um diagnóstico pré-natal após confirmação de uma doença genética ou após resultado de um teste pré-sintomático ou de heterozigotia, ou mesmo de serem submetidos a um teste genético cujo resultado não podem evitar nem são obrigados a saber. Por outro lado, e apesar do Estado alegar a necessidade de gerir da melhor maneira recursos cada vez mais escassos, é difícil sustentar esta alegação em todos os casos com a acusação de incúria, mesmo que se tratasse de um exame expressamente imposto por lei. Nestes casos, seria penalizado um titular autónomo de um direito constitucional à segurança social (artº 63º, nº4, da Constituição Portuguesa), que até pode ser deficiente (artº 71º, Código Penal), e que assim ficaria privado de prestações sociais por um facto do qual não tem qualquer culpa. A falta de cumprimento dos deveres dos pais (se é que pode ser considerado um dever) não pode legitimar a privação concreta

das prestações, atribuídas a outros cidadãos com as mesmas necessidades que as suas.

6.5. Possibilidade de um rastreio genético de portadores para a ataxia de Friedreich

Apesar de todas as questões éticas anteriormente levantadas pelo conhecimento do estatuto genético dos indivíduos (mais concretamente pela genética preditiva), que poderão ser sujeitos a actos de discriminação e estigmatização em vários contextos da sociedade, a sua aplicação na prevenção de doenças hereditárias é fundamental. Representa um importante avanço nesta área da medicina, pela sua contribuição na diminuição da prevalência de várias doenças hereditárias e para o melhor acompanhamento das famílias afectadas. Neste sentido, e considerando os resultados obtidos neste trabalho, importa agora reflectir sobre o caso da FRDA e, de que forma a medicina preditiva poderá contribuir para a diminuição desta doença na nossa população.

Neste trabalho, foi utilizado um biobanco de amostras de sangue seco em cartões, mais conhecidos como cartões *Guthrie*, usados no rastreio neonatal ou “teste do pezinho”, o qual cobre cerca de 99% da população portuguesa (Osório, 2006). Estas amostras são colhidas para o rastreio de algumas alterações genéticas que possam afectar o recém-nascido e que

podem ser remediadas logo desde essa altura. A importância deste rastreio é claramente indiscutível no tratamento destas doenças, mas, poderia ou deveria ele ser alargado a outro tipo de anomalias genéticas, que pela sua gravidade justificassem a identificação dos portadores, potenciais fontes de transmissão da doença? Esta foi a questão de raiz levantada por este trabalho.

A ataxia de Friedreich, como doença recessiva que é, pode transmitir-se quando dois portadores geram um filho, que terá 25% de risco de vir a ser doente. A mutação da FRDA existe na população concentrada em portadores que serão sempre assintomáticos, pelo que o controlo da doença é impossível a não ser pelo rastreio em cascata (no âmbito de aconselhamento genético) das famílias onde já se encontrou um membro afectado (probando). Os familiares portadores vão sendo encontradas, quando testados por uma qualquer ligação familiar com o probando.

Nesta discussão, não serão considerados apenas os membros das famílias já afectadas pela doença, alvos de aconselhamento genético e rastreio em cascata, mas também a população em geral, na qual se levantam os mesmos e outros problemas éticos.

Rastreio neonatal na FRDA?

O carácter obrigatório do rastreio desta ou daquela doença genética - como já acontece em vários estados norte-americanos com a fenilcetonúria, a fibrose quística e a anemia das células falciformes (Oliveira, 1995/1996) - poderá vir a ser discutido, dado que a prevenção das manifestações tardias destas doenças significa uma economia considerável para os sistemas de saúde, gerindo recursos escassos que podem ser aplicados noutros domínios (Oliveira, 1996/1997). No entanto, não se deve esquecer o facto de os Estados se verem obrigados a defender a liberdade individual, mesmo que acarretem custos pela livre escolha dos seus membros.

No quadro das doenças genéticas, não se coloca a questão do contágio e, portanto, da defesa de um interesse público relevante e capaz de justificar um rastreio obrigatório. Será mais simples uma sugestão baseada na sensibilização, do que uma imposição legal para a realização destes rastreios, o que acontece no nosso país com o rastreio neonatal da fenilcetonúria e hipotiroidismo congénito, alargado agora para dezassete disfunções genéticas e metabólicas (Comissão Nacional para o Diagnóstico Precoce, 2005). Não é um procedimento obrigatório, mas sim baseado na sensibilização, conseguindo estender-se a cerca de 99% da população, para rastreio de doenças que podem ser evitadas logo à nascença.

No caso específico da FRDA, sendo esta uma doença recessiva, um rastreio deste tipo iria encontrar, além dos doentes, também uma série de portadores. Como já foi referido, este tipo de procedimento de nada iria servir para a erradicação da doença. A detecção de portadores (heterozigotos) logo à nascença, apenas serviria para identificar uma mutação genética num indivíduo menor, assintomático e que nada viria a sofrer com esta alteração, a não ser uma possível discriminação em face desta descoberta. Resultaria, quanto muito, num alerta especial aos seus pais para a necessidade de aconselhamento genético na altura que este pretendesse ter filhos. A detecção dos homozigotos atribuiria um estatuto de doente a um indivíduo menor, aparentemente saudável, que ficaria a saber à partida que um dia mais tarde irá provavelmente desenvolver uma doença genética (seria um teste pré-sintomático). Esta tomada de conhecimento poderá prejudicar seriamente a criança e os seus pais que terão que suportar o peso de uma informação difícil de gerir, durante o crescimento e desenvolvimento do seu filho. Acima de tudo, sendo a FRDA uma doença sem cura e sem tratamento eficaz para evitar a sua progressão, de nada adiantaria este tipo de rastreio, estando apenas associado a prejuízos para a criança.

Rastreo pré-concepcional na FRDA?

No caso de doenças genéticas herdadas de forma recessiva e ainda sem cura, nas quais a alteração genética dos indivíduos apenas poderá afectar a sua descendência, a única forma de controlar a sua disseminação pela população será um controlo antes do nascimento, mais precisamente antes da procriação.

Conforme outros exemplos, descritos em várias outros países do mundo (ex: programa de erradicação da talassémia em Chipre, na Sardenha e na Turquia), um rastreio pré-matrimonial (ou, talvez mais correctamente, pré-concepcional) consistiria na contribuição mais eficaz da medicina preditiva na prevenção desta doença genética.

No entanto, para que se justificasse um rastreio deste tipo, a frequência da mutação causadora da FRDA teria que ser suficientemente elevada, para que o risco de dois portadores se unirem transmitindo as mutações à sua descendência fosse também ele elevado. Na literatura, a frequência da mutação causadora da FRDA, está descrita como sendo de 1:60 a 1:100 (Bidichandini, 2004) para a população caucasiana. Estes valores foram obtidos por estimativas dos casos observados pelos vários laboratórios que estudam a doença. Com a excepção da Finlândia (Juvonen, 2002), não foi descrito até ao momento

nenhum outro estudo de base populacional para determinação da frequência de portadores para a FRDA.

Na eventualidade de se justificar a realização de um rastreio pré-concepcional, os aspectos éticos e a problemática da discriminação genética teriam que ser igualmente ponderados. A obrigatoriedade deste rastreio seria de mais fácil justificação, atendendo à gravidade da doença e à ausência de cura ou tratamento. O encarar deste caso como um problema de saúde pública, poderia justificar a utilização de um teste genético como requisito de procriação, pois o interesse em proteger a sociedade e o bem comum deveria prevalecer sobre a vontade individual e o direito à privacidade de cada um.

Atendendo à observação na consulta de aconselhamento genético do CGPP das famílias apresentadas como razão deste estudo, surgiu a hipótese da frequência desta mutação estar aumentada na população portuguesa. O facto de através de uma família se conseguirem encontrar duas outras em que não havia ainda nenhum probando (nenhum doente nascera ou fora detectado) e, que de outra forma nunca teriam sido descobertas, chamou realmente à atenção para esta hipótese. Apesar desta evidência, a frequência da mutação na população portuguesa encontrada foi de 1:106 indivíduos, a qual está de acordo com a frequência estimada para outras populações caucasianas. Com uma frequência relativamente pequena, o risco da união de dois portadores,

aproximadamente $1:(106)^2$ ou 1:11.000 casais da população geral (segundo a lei de Hardy-Weinberg) é diminuído, e ainda mais o é, o risco do nascimento de um indivíduo afectado (cerca de 1:45.000) (Stracham and Read, 2004). Com estas evidências, a implementação pelo Serviço Nacional de Saúde (SNS) português de um rastreio pré-concepcional para a FRDA, seria verdadeiramente desnecessário e dispendioso. Neste caso em particular, dada a raridade da doença e a relativamente baixa frequência da mutação na população geral (comprovada agora com este trabalho) este tipo de programa não se justifica.

Rastreio em cascata na FRDA?

Ao contrário das doenças em que a prevalência é muito elevada, o rastreio da FRDA deverá ser centrado nas famílias afectadas, após aconselhamento genético. É com programas deste tipo que a medicina preditiva desempenha um papel fulcral na prevenção desta doença genética, assim como em outras com as mesmas características. No entanto, foram já levantadas questões éticas em relação à autonomia dos familiares que pode ser posta em causa com este tipo de rastreios. Eles não devem ser sujeitos a qualquer tipo de pressão para participarem no rastreio, o que é considerado invasão de privacidade pelo seu direito a não conhecerem o risco que correm. Por isso, ao contrário do que se passa

noutros países, como na Holanda, em que após descoberto um probando os médicos tentam contactar os familiares mais próximos, na tentativa de testar o resto da família (De Wert, 2005), os rastreios em cascata devem ocorrer apenas no âmbito do aconselhamento genético quando os familiares, depois de informados, pretendem realizar o teste por vontade própria.

6.6. Utilização de um biobanco de Guthries

Neste trabalho, de forma a se conseguir uma melhor e mais correcta representatividade da população portuguesa, foi usada como amostra um grande conjunto de cartões *Guthrie*, distribuídos de acordo com a densidade populacional de cada distrito do país e de acordo com o sexo. Conforme foi já referido, esta é uma população controlo ideal, pois são eliminados todos os possíveis enviesamentos.

A utilização deste biobanco de *Guthries*, neste estudo de investigação populacional é de inegável importância em termos de evolução do conhecimento e uma mais valia na estimativa dos riscos a que as famílias FRDA estão sujeitas, beneficiando o processo de aconselhamento genético. Este tipo de utilização tem uma importância extrema e inegável. O conhecimento obtido nestes estudos é fundamental para uma contínua melhoria no aconselhamento genético de famílias afectadas por doenças hereditárias.

Mas, será lícita a sua utilização em estudos diferentes daquele para o qual foram colhidas as amostras? Pela Lei nº 12/2005 (artº 19º nº 7), estes biobancos de amostras de sangue seco em papel (cartões *Guthrie*) obtidas em rastreios neonatais podem ser usadas em investigação genética, desde que devidamente anonimizadas, tal como foi feito neste caso.

Mas, será que os indivíduos em quem foram obtidas as amostras (ou os seus pais), isto é, seus proprietários (Lei nº 12/2005, artº 19º, nº13) aceitariam a sua utilização em estudos diferentes daqueles para que foram recolhidas as amostras à nascença? Poderá o seu material biológico ficar armazenado por período indefinido, quando aparentemente não precisam da sua conservação para utilidade própria ou dos seus familiares actuais e futuros? O material colhido com o objectivo puro e simples de um rastreio neonatal de duas doenças (actualmente dezassete), só precisaria de ser armazenado enquanto for comprovada a sua utilidade ou quando for obtido consentimento específico. Esse parece ser o espírito da Lei nº 12/2005 (artº 19º, nº13). Na verdade, a maioria das amostras armazenadas neste biobanco não tem qualquer utilidade para os seus proprietários, que não apresentam qualquer tipo de anomalia genética individual ou familiar, desconhecendo praticamente todos eles, o facto das suas amostras biológicas (potenciais fontes de informação genética) estarem ainda armazenadas.

Constituição do biobanco

A importância dos biobancos é inegável, mas os seus potenciais perigos também, principalmente quando os depositários não deram consentimento para a sua constituição.

A segurança da privacidade e confidencialidade destes biobancos e dados que lhe estão associados deverá ser muito bem controlada. Mas, é também crucial que possa haver um consentimento informado escrito dos proprietários (Lei nº 12/2005, artº 19º, nº5), para o armazenamento das amostras e todas as possíveis investigações que possam vir a ser feitas com esse material.

Apesar de garantida a privacidade e confidencialidade da informação genética, e mesmo alegando a extrema importância destes estudos, ninguém deveria poder ser objecto de estudo não autorizado. Qualquer colheita biológica só pode ser estritamente utilizada com a finalidade para a qual foi colhida ou para as quais o dador expressou o seu consentimento (Lei nº 12/2005, artº 19º, nº5). Aliás, no artº 19º, nº 15 da mesma lei, o termo “consentimento” é citado de forma que faz subentender a necessidade da sua obtenção para colecção e manutenção destes bancos. No nº17 fala-se mesmo

do consentimento específico para o propósito da criação do banco.

Apesar da sua importância, não podemos esquecer, que este biobanco de *Guthries* não é constituído apenas por indivíduos doentes cuja necessidade de conservação das suas amostras no banco seria mais obviamente compreensível, mas também por amostras de indivíduos saudáveis (na sua esmagadora maioria). Estes não têm qualquer benefício pessoal, podendo apenas contribuir para um desenvolvimento do conhecimento científico, objectivo muito altruísta, mas que deve ser espontâneo e consentido.

“Bancos de DNA e outros produtos biológicos”

(Lei nº 12/2005)

O artº 19º, nº5 da Lei nº 12/2005 não deixa qualquer dúvida quanto à necessidade de obtenção do consentimento informado escrito, para a colheita e utilização de amostras num banco de produtos biológicos. O biobanco dos cartões *Guthrie* não é excepção.

Se, por algum motivo for impossível obter consentimento posterior (como no caso de grandes colecções já constituídas), estas podem ser utilizadas para efeitos de investigação, desde que as amostras sejam irreversivelmente anonimizadas (artº 19º, nº6 e nº7). De qualquer forma, para evitar problemas

futuros, o consentimento para o armazenamento deveria referir também possíveis utilizações futuras (com outros fins distintos do rastreio inicial), consentimento esse que poderia ser de fácil obtenção, baseado na correcta sensibilização dos progenitores, não prejudicando por isso a investigação científica.

Apesar destas evidências, no n.º 6 deste art.º 19.º, permanece a dúvida se um estudo deste tipo com finalidade única de obtenção de dados epidemiológicos ou estatísticos necessita do consentimento específico para esse fim. Desde que cumprida a anonimização das amostras, poderá ser realizado sem autorização específica para essa finalidade (como aconteceu neste estudo), o que não invalida a necessidade de consentimento escrito para a recolha e armazenamento da amostra, responsabilidade da instituição depositária das amostras biológicas que constituem o biobanco.

Deve ser lembrado que, por todas as dúvidas ainda existentes na interpretação desta Lei, a entidade depositária destas amostras (IGM) apenas forneceu para este estudo, material biológico colhido e armazenado antes da publicação da mesma.

A importância de um consentimento

De forma a ultrapassar todas as controvérsias que surgem na interpretação legislativa acerca da constituição, manutenção e utilização de biobancos, nomeadamente do biobanco de *Guthries*, a obtenção de um consentimento informado por parte dos progenitores na altura da realização do rastreio neonatal resolveria todos estes problemas. A alegação de um prejuízo para a futura investigação científica comprovadamente necessária, não representa um fundamento válido para a não necessidade de obtenção de consentimento. Sem este, é que a investigação poderá ficar comprometida, pois os objectos de estudo apesar de salvaguardados por todas as garantias de confidencialidade e privacidade, não foram respeitados no seu direito de liberdade de escolha. Ninguém pode ser forçado a participar num estudo sem ter tido sequer o conhecimento que isso poderia acontecer. Certamente que uma sensibilização adequada dos progenitores na altura do rastreio, não evitaria a obtenção do consentimento escrito dos pais, que permitiriam na grande maioria, sem qualquer reserva, esses mesmos estudos futuros.

6.7. Utilização de Guthries na resolução de casos forenses

Remetendo agora para a questão da utilização deste tipo de amostras na resolução de casos forenses, este problema não fica muito bem esclarecido com a lei actual. No artº 19º, nº 9 da Lei nº 12/2005, é referido que as amostras identificadas ou identificáveis ficam limitadas a estudos que não possam ser feitos de outro modo. Estarão aqui incluídos os estudos forenses? Não há uma distinção clara entre estudos científicos e estudos forenses, ou mesmo entre investigação genética, científica ou forense. Apenas é referido que os bancos de produtos biológicos constituídos para fins forenses, devem ser objecto de regulamentação específica (artº 19º). Isto não significa que os outros bancos referidos até ao momento, não possam ser utilizados para estudos nesse âmbito. No nº11 do mesmo artigo, salienta-se o facto de que quando houver muita necessidade de se usar as amostras identificadas ou identificáveis, estas serão codificadas e a informação restringir-se-á a instituições públicas. Poderá uma entidade como o Ministério Público, conseguir usar a informação obtida de uma amostra identificável? A lei não é explícita nesse sentido.

Foi já referido um possível interesse na utilização de informação genética (codificante ou não) em casos forenses,

mas mais interessante ainda parece o acesso a este biobanco de *Guthries*, onde se conseguirá obter informação de praticamente toda a população portuguesa. À partida, esta situação não parece possível, mas a lei é omissa na proibição da utilização da medicina preditiva e da genética médica em questões forenses, bem como do uso de amostras armazenadas para resolver casos judiciais. Principalmente, se considerarmos a hipótese dos proprietários das amostras não terem dado o seu consentimento para a colheita e armazenamento e por isso não terem definido que as amostras não podiam ser usadas com outros fins.

Suspeita de crime

Tentando pensar-se em aplicações mais práticas, podem surgir diferentes situações. No caso de um suspeito desaparecido que tenha deixado vestígios de material biológico, bastaria uma confirmação com a sua amostra armazenada para comprovar ou excluir a sua culpa. Poderá a instituição depositária das amostras negar esta informação a uma entidade judicial, quando nem sequer tem consentimento para o armazenamento das amostras?

Em casos de identificação, quando não há qualquer outro tipo de material para comparar o genótipo, parece lícito a utilização de um biobanco deste tipo para um estabelecimento da identidade individual de corpos não identificados em vez de

se ter que recorrer a familiares, muitas vezes afastados, o que origina resultados com menor probabilidade de concordância e muito mais trabalhosos e dispendiosos. Seria seguramente uma mais valia no caso de grandes catástrofes, quando não resta mais nenhuma forma de identificar os cadáveres. Um outro caso, poderá ser o de uma vítima desaparecida cuja única pista é um vestígio deixado num suspeito. Provando que a amostra corresponde mesmo a essa pessoa, o seguimento da pista e a resolução do caso estaria provavelmente muito facilitada, com a associação do suspeito à vítima.

Mas, será eticamente correcta esta utilização para fins forenses? Considerando, é claro, que na maioria das vezes essa utilização se restringe à ajuda de pessoas (vítimas desaparecidas ou sem provas contra o suspeito, e familiares de corpos não identificados) a resposta será afirmativa, tendo em conta que muito provavelmente dariam consentimento para a utilização dessas amostras como meio de prova.

O caso de suspeitos, mais uma vez, será diferente. Como já foi referido para a utilização da medicina preditiva a nível criminal, também neste caso, eles nunca dariam o seu consentimento. Poder-se-ia então usar essa informação? Este problema remete-nos para a discussão da constituição de bases de dados genéticos de interesse criminal, que não é objectivo desta dissertação discutir. Em ambos os casos, o que está em questão é a possibilidade de usar informação genética do suspeito sem este dar a sua autorização. De qualquer

forma, em situações de investigação criminal ditas normais, também deverá ser o tribunal a dar a ordem para a colheita de amostras de indivíduos suspeitos de crime. Então porque não bastaria, neste caso, a ordem de um tribunal, desde que essa utilização se restringisse à utilização do DNA não codificante, prática comum em casos forenses? A grande vantagem estaria nos casos em que o suspeito ainda não foi encontrado (para se colher material biológico a ser comparado com o dos vestígios) e nos quais, a constituição de prova poderia ser mais célere com uma mais fácil resolução do caso. O mesmo se passa com as bases de dados genéticos, onde a justificação principal é a obtenção de perfis genéticos para utilização em casos que ficam muitas vezes por resolver, devido á falta do suspeito (Corte-Real, 2004). Com a constituição de uma base de dados genéticos, parte dos problemas seriam resolvidos, mas continuarão sempre a existir suspeitos e indivíduos não identificados cujo perfil genético não se encontra nessa base de dados (que seria constituída por criminosos habituais, isto é, com pelo menos uma condenação anterior), e nos quais seria fundamental a utilização de um banco de *Guthries*.

Casos de filiação biológica

Uma outra utilização possível destes biobancos poderia ser na resolução de casos de paternidade quando algum dos

intervenientes já possa não estar presente. Por exemplo, no caso de uma suspeita de não paternidade de um pai já falecido, ou mesmo de uma negação de paternidade, por qualquer motivo, após falecimento desse progenitor. Também uma suposta maternidade pode ser posta em causa, embora não seja tão provável. A utilização de material biológico do progenitor falecido, em vez de DNA de familiares, facilitaria o processo de averiguação de paternidade com uma exclusão ou confirmação muito mais seguras. Também quando surge a situação de uma criança já falecida, se poderá colocar esta questão, para a resolução do caso.

Por outro lado, a utilização de amostras *Guthrie* de presumíveis progenitores que se recusem a colaborar no teste de paternidade, não poderá ser aplicável no nosso regime jurídico, o qual prevê uma recusa por parte deste(a), embora isso seja usado contra ele(a) em tribunal (Pinheiro, 2002).

Na Nova Zelândia, em 1999, foi requisitado em tribunal a utilização de uma amostra de sangue em cartão *Guthrie* numa acção de averiguação oficiosa de paternidade num caso em que a criança já tinha morrido. Apesar do facto da mãe alegar não ter dado o seu consentimento informado para o armazenamento da amostra do seu filho, o tribunal requisitou o teste da amostra para a resolução do caso (Kharaboyan et al, 2004).

Consentimento para esta utilização

A falta de consentimento para o rastreio neonatal pode gerar vários conflitos e tentativas de utilização para outros fins, uma vez que não foi acordado com os progenitores quais as possíveis utilizações das amostras, nem assegurado pela entidade depositária a total segurança das amostras em função do consentimento.

Existirão alguns “teóricos da conspiração” que temem que, com o evoluir da ciência, as facilidades permitidas pelas novas tecnologias venham a tornar possível a utilização dos bancos de cartões *Guthrie* como verdadeiras bases de dados genéticos, com possível interesse criminal. Esta é com certeza uma visão extremista de uma situação, que poderá ser até bastante benéfica dentro de limites bem controlados.

Poderia ser bastante produtiva a discussão entre especialistas das diferentes áreas envolvidas (genética, bioética e forense) acerca da obtenção um consentimento informado na altura da colheita da amostra, que focasse esta possível e eventual utilização dos *Guthries*. Com uma visão optimista da questão, não haveria muitos progenitores que objectassem, considerando que um dia mais tarde poderia ser esse consentimento que salvaria a vida do seu filho (ou outro familiar). Mas, também o poderia condenar. Talvez fossem

poucos os pais que recusariam um consentimento por consideraram a hipótese do seu filho ser constituído suspeito de algum crime no futuro, mas é uma hipótese bastante subjectiva.

Deverá então ser considerada e discutida, a possibilidade desta utilização por imposição jurídica, com fundamentação caso a caso.

6.8. Contributo médico-legal desta dissertação

Apesar do trabalho experimental desenvolvido nesta tese ter uma aplicação directa na área da genética médica, ao considerar a possível contribuição da medicina preditiva na prevenção de doenças hereditárias, serviu também para levantar questões éticas muito importantes que se colocam com a utilização da informação genética e com o armazenamento de amostras biológicas.

Atendendo à crescente evolução da genética médica, estas questões podem, num futuro bem próximo, constituir graves problemas para resolução das entidades judiciais. Estes profissionais deverão estar atentos para esta possibilidade, discutindo desde já as melhores formas de resolução destas problemáticas, como a discriminação em face do património genético e o armazenamento de amostras biológicas,

potenciais fontes de informação a qualquer momento. A medicina legal deverá desde já, considerar a necessidade de intervenção em situações desta natureza.

Uma outra proposta avançada nesta dissertação foi a possibilidade de utilização de DNA codificante e da medicina preditiva em alguns casos de contexto forense. Como é óbvio essa utilização deverá ser efectuada dentro de limites bem controlados, mas poderá ser benéfica para a resolução de casos médico-legais que de outra forma não poderiam ser resolvidos.

Também foi proposta a possibilidade de utilização do biobanco de cartões *Guthrie* do rastreio neonatal, na resolução de casos forenses (quer criminais, quer com fins de identificação individual ou resolução de certos casos de filiação biológica). Foram demonstradas as mais valias de ambas as possibilidades, sendo, no entanto, necessária a discussão entre peritos de diversas áreas multidisciplinares, para se estabelecerem as regras dessa utilização, de forma a evitar os abusos que ultrapassem os limites de actuação.

Apesar do medo da utilização indevida dos testes genéticos e das amostras biológicas armazenadas em biobancos parecer irracional, deve ser reconhecido que numa era em que os testes genéticos estão a ficar cada vez mais disponíveis, estas questões precisam ser activamente discutidas de forma a assegurar a protecção dos indivíduos testados e a integridade

da confiança pública nas instituições de prestação de serviços na área da genética médica.

Toda esta discussão passará com certeza pela necessidade obrigatória de um consentimento informado escrito para a constituição destes biobancos, consentimento esse que só trará benefícios, quer para a investigação científica na área da genética médica, quer para a investigação forense, quer para a segurança dos próprios indivíduos.

7. Conclusões

7. Conclusões

A ataxia de Friedreich é uma doença genética de transmissão recessiva, com uma expressão grave e início geralmente na infância ou juventude. Estes parecem motivos suficientes para a adopção de medidas preventivas, de forma a diminuir a incidência desta doença. Para tal, foi necessário conhecer a frequência da mutação $(GAA)_n$ do gene da FRDA na população portuguesa e, assim, avaliar a necessidade e a possibilidade de um rastreio genético da doença.

- ⇒ A frequência de portadores da expansão $(GAA)_n$ (heterozigotos) na população portuguesa encontrada neste estudo foi de 1:106.
- ⇒ Este passará a ser o valor de referência ($\sim 1/100$) a utilizar no aconselhamento genético das famílias afectadas (em vez de 1/60 a 1/120, como até aqui).
- ⇒ Esta frequência de portadores permite ainda prever que o número de doentes no nosso país deverá ser cerca de 1:45.000 (ou seja, próximo de 220). Cerca de um terço dos doentes portugueses têm já o diagnóstico confirmado molecularmente.

- ⇒ Foi estimada uma prevalência para a FRDA em Portugal de 2: 100.000.
- ⇒ Apesar de alta, a frequência de portadores não será suficientemente elevada para justificar a implementação de um programa de rastreio pré-concepcional aos casais que pretendem ter filhos, semelhante ao que tem acontecido noutros países com outras doenças recessivas. Os custos seriam demasiado elevados, comparados com os benefícios para a saúde pública
- ⇒ Atendendo a que a FRDA é uma doença sem cura ou tratamento disponível até ao momento, o seu despiste familiar realizado em contexto de aconselhamento genético pode ajudar a diminuir a prevalência da doença, intervindo-se no momento em que ela pode ser transmitida à descendência.
- ⇒ Este estudo, pela primeira vez realizado em Portugal, revelou-se pois, importante para um conhecimento mais aprofundado sobre a FRDA e sua prevenção na população portuguesa.
- ⇒ Representa um importante contributo, no âmbito do aconselhamento genético das famílias afectadas por esta doença hereditária, permitindo uma melhor avaliação dos riscos a que estão sujeitas.

Com este estudo, ficou também demonstrada a enorme importância da utilização de um biobanco de *Guthries* resultante do rastreio neonatal da fenilcetonúria e hipotiroidismo congénito.

- ⇒ Estas amostras têm um valor fundamental para estudos epidemiológicos, os quais contribuem para um melhor conhecimento de doenças hereditárias e para uma mais segura avaliação dos riscos nas famílias afectadas.
- ⇒ Podem representar ainda um recurso valioso para outro tipo de estudos de investigação que conduzam a avanços científicos no conhecimento de doenças genéticas graves.
- ⇒ A existência deste biobanco é também crucial no âmbito de aconselhamento genético de familiares em risco, ao possibilitar a utilização retrospectiva de amostras para o diagnóstico de crianças já falecidas (impossíveis de obter de outra forma).
- ⇒ A utilização deste tipo de biobanco para resolução de casos forenses pode também representar uma mais valia importante na protecção e ajuda a vítimas, na resolução de casos de filiação biológica, na identificação individual (corpos e desaparecidos), e mesmo na identificação de suspeitos, se respeitados os princípios éticos devidos e a legislação nacional e comunitária.

⇒ De modo a salvaguardar as questões éticas e legais levantadas pela constituição, manutenção e utilização deste biobanco, será sempre fundamental a obtenção de consentimento informado por escrito, na altura da colheita, com base numa adequada sensibilização dos pais.

Nesta dissertação foram colocadas e discutidas questões pertinentes, nas quais deverão intervir especialistas em genética, equipas forenses, e elementos ligados ao direito e à bioética. Como resultado desta discussão colocam-se novos desafios que podem facilitar a resolução de casos, muitas vezes de difícil ou impossível solução, sem com isso prejudicar os direitos individuais ou pôr em causa o princípio da não discriminação em face do património genético.

8. Referências

8. Referências

American Society of Human Genetics, "statement on informed consent for genetic research", *Am J Hum Gen*; 59:471-474, 1996.

Andrews LB, "Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies: overview of legal issues", *Pediatrics*; 83(5 part 2):886-90, May 1989.

Angastiniotis M, "Cyprus:Thalassemia programme", *The Lancet*; 336:1119-1120, 1990.

Archer L, "Predizer o futuro já hoje", *Brotéria*, vol 146, 3, pag 351-358, Março de 1998.

Asai A, Ohnishi, Nishigaki E, Sekimoto M, Fukuhara S, Fukui T, "Attitudes of the Japanese public and doctors towards use of archived information and samples without informed consent:preliminary findings based on focus groups interviews", *BMC Medical Ethics*; 3(1), 2002.

Babcock M, De Silva D, "Regulation of mitochondrial iron accumulation by YFH1P, a putative homolog of frataxine", *Science*; 276(5319):1709-1715, 1997.

Ballas SK, Park D, Wapner RJ, "Neonatal screening for sickle cell disease in a metropolitan university hospital: efficacy and problems", *J Med Screen*; 1(4):229-32, Oct 1994.

Benecke M, "Coding or non-coding, that is the question", *EMBO reports*, vol 3, nº6, 2002.

Bidichandani S, Ashizawa T (updated 25 august 2006). Friedreich Ataxia In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2005. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [30-08-2006].

Bidichandani S, Purandare SM, Taylor E, Gumin G, Machkhas H, Harati Y, Gibbs R, Ashizawa T, Patel P, “ Somatic sequence variation at the Friedreich ataxia locus includes complete contraction of the expanded GAA triplet repeat, significant length variation in serially passaged lymphoblasts and enhanced mutagenesis in the flanking sequence”, Human Molecular Genetics; 8(13):2425-2436, 1999.

Billings P, Kohn M, Cuevas M, Beckwith J, Alper J, Natowicz M, “Discrimination as a consequence of genetic testing”, American Journal Human Genetics; 50:476-482, 1992.

Borry P, Fryns JP, Schtsmans P, Dierickx K, “Carrier testing in minors: a systematic review of guidelines and position papers”, European Journal of Human Genetics, 14:133-138, 2006.

Brice A, “Friedreich ataxia”, Orphanet Encyclopedia, October 2004, <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-friedreich.pdf>

Bunce M, Bit-Avragim N, Riefflin A, Perrot A, Schmidt O, Kreuz FR, Dietz R, Jung WI, Osterziel KJ, “Cardiac energetics correlates to myocardial hypertrophy in Friedreich’s ataxia”, Ann Neurol; 53:121-3, 2003.

Cambon-Thompson A, “The social and ethical issues of post-genomic human biobanks, Nature reviews, Genetics, 5:866-873, 2004.

Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindlang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish SJ, Faucheux B, Trouillas P, Authier FJ, Dun A, Mandel JL, Vescovi A, Pandolfo M, Koenig M, “Frataxin is reduced in Friedreich

ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes“, Human Molecular Genetics;6(11):1771-1780, 1997.

Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A et al, Friedreich ‘s ataxia:autosomal recessive disease causes by an intronic GAA repeat expansion, Science, Mar 8;271(5254):1423-7, 1996.

Cao A, Pintus L, Lecca U, Olla G, Cossu P, Rosatelli C, Galanello R, “Control of homozygous beta-thalassemia by carrier screening and antenatal diagnosis in Sardinians”, Clin Genet, 26(1):12-22, 1984.

Christodoulou K, Deymeer F, Serdaroglu P, Ozdemir C, Poda M, Georgius DM, Ioannou P, Tsingis M, Zamba F, Middleton LT, “Mapping of the second Friedreich’s ataxia (FRDA2) locus to chromosome 9p23-p11: evidence for further locus heterogeneity”, Neurogenetics ;3(3):127-32, Jul 2001.

Comissão Nacional para o Diagnóstico Precoce, relatório anual de 2005, <http://www.igm.min-saude.pt/>.

Comissão Nacional de Protecção de Dados (CNPD), Autorização nº 9/2000 , Janeiro de 2000.

Comitte on Genetic testing/Insurance Issues, American society of Human Genetics, “Background Statement: Genetic Testing and Insurance”, American Journal of Human Genetics;56:327-331, 1995.

Corte-Real F, “Forensic DNA databases”, Forensic Science International; 146S:143-144, 2004.

Cossé M, Puccio H, Gansmuller A, Koutnikova H, Dierich A, LeMeur M, Fischbeck K, Dollé P, Koenig M, “Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene locus leads to early embryonic lethality without iron accumulation”, *Humam Molecular Genetics*; 9(8):1219-1226, 2000.

Cossé M, Schmitt M, Campuzano V, Reutenauer L, Moutou C, Mandel JL, Koenig M, “Evolution of the Friedreich ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and permutations, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 94:7452-7457, 1997.

Cuda G, Mussari A, Concolino D, Constanzo F, Strisciuglio P, “co-existence of frataxin and cardiac troponin T gene mutations in a child with Friedreich ataxia and familial Hypertrophic Cardiomyopathy”, *Human Mutation*, mutation in brief#490, 2002.

De Michelle G, Cavalcanto F, Criscuoto C, Pianese L, Monticelli A, Filla A, Coccozza S, “Parental gender, age at birth and expansion length influence GAA repeat intergenerational instability in the X25 gene: pedigree studies and analisys of sperm from patients with Friedreich ataxia”, *Human Molecular Genetics*; 7(12):1901-1906, 1998.

De Wert G, “Whose information is it anyway?”, *European Journal of Human Genetics*; 13:397-398, 2005.

Delatycki MB, Paris DB, Gardner RJ, Nicholson GA, Nassif N, Storey E, MacMillan JC, Collins V, Williamson R, Forrest SM, “Clinical and genetic study of Friedreich ataxia in an Australian population”, *Am J Hum Genet*; 87:168-74, 1999.

Despacho nº 9108/97 (2ª série), *Diário da República*, II Série, nº 237, pag 12539, Setembro de 1997.

Despacho (extracto) n° 2584/2006 (2ª série) , Diário da República, II Série, n° 24, pag 1518-1519, 2 de Fevereiro de 2006.

Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, Brice A, Koenig M, “Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich’s ataxia”, New England Journal of Medicine; 335:11069-75, 1996.

Emond M, Lepage G, Vanasse M, Pandolfo M, ”Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia”, Neurology; 55:1752-3, 2000.

Epplen C, Epplen JT, Frank G, Mitterski B, Santos EJ, Schols L, “Differential stability of the (GAA)_n tract in the Friedreich ataxia (STM7) gene”, Human Genetics; 99:834-6, 1997.

Filla A, De Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G, Coccozza S, “The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia”, Am J Hum Genet; 59(3):554-60, Sep 1996.

Fisher NL, “Genetic testing and health insurance: Can they coexist?”, Cleveland Clinic Journal of Medicine; 71(1):8-9, Jan 2004.

Godard B, Kate L, Evers-Kiebooms G, Aymé S, “Population genetic screening programmes: principles, techniques, practices, and policies”, European Journal of Human Genetics; 11, suppl 2: S49-S87, 2003.

Godard B, Schmidtke J, Cassiman JJ, Aymé S, “Data storage and DNA banking for biomedical research: informed consent, confidentiality, quality issues, ownership, return of benefits. A professional prespective”, European Journal of Human Genetics, 11, suppl 2: S88-S122, 2003.

Goldberg IV, “Genetic Information privacy and discrimination”, Health Care Manager; 20(1):19-28, 2001.

Goldim JR, Matte U, “Bancos de DNA, considerações éticas sobre o armazenamento de material genético”,

<http://www.bioetica.ufrgs.br/bancodn.htm>, última actualização a 6/07/1999.

Hellenbroich Y, Schwinger E, Zuhlke Ch, “Limited somatic mosaicism for friedreich’s ataxia GAA triplet repeat expansions identified by small pool PCR in blood leukocytes”, Acta Neurol Scand; 103:188-192, 2001.

Hirtzlin I, Dubreuil C, Préaubert N, Duchier j, Jansen b, Simon J et al on behalf of the EUROGENBANK, “An empirical survey on biobanking of human genetic material and data in six EU countries”, European Journal of Human Genetics, 11 :475-488, 2003.

Hodge JG, “Ethical issues concerning genetic testing and screening in public health”, American Journal of Medical Genetics Part C (Semin. Med.Gen.), 125C:66-70, 2004.

Human Genetics Society of Australasia, Royal Australasian College of physicians, “Policy statement on the retention, storage and use of sample cards from newborn screening programs”, <http://www.hgsa.com.au/policy/>, 2004.

Juvonen V, Kulmala SM, Ignatius J, Penttinen M, Savontaus ML, “Dissecting the epidemiology of a trinucleotide repeat disease- example of FRDA in Finland”, Hum Genet, 110:36-40, 2002.

Keskin A, Turk T, Polar A, Koyuncu H, Saracoglu B, “Premarital screening of beta-thalassemia trait in the province of Denizli,Turkey”, *Acta Haematol*; 105(4):252, 2001.

Kharaboyan L, Avard D, Knoppers BM, “Storing newborn blood spots: modern controversies”, *Journal of Law medicine & Ethics*, 32 (4):741-8, 2004.

Kimura S, Saito Y, Kaneko K, Nezu A, “A case of Friedreich ataxia having no abnormal gene”, *No To Hattatsu*; 34(4):343-6, Jul 2002.

Labuda M, Labuda D, Miranda C, Poirier J, Soong BW, Barucha NE, Pandolfo M, “Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion”, *Neurology*; 54:2322-2324, 2000.

Lamarche JB, Shapcott D, Côté M, Lemieux B, “Cardiac iron deposits in Friedreich ataxia”, *Handbook of cerebellar diseases*, 1st ed, Marcel Dekker, New York, pag 453-458, 1993.

Lamont PJ, Davis MB, Wood NW, “ Identification and sizing of the GAA trinucleotide repeat expansion of Friedreich’s ataxia in 56 patients, clinical and genetics correlates”, *Brain*; 120:673-680, 1997.

Lei nº 10/91 “Lei da Protecção de dados Pessoais face à informática”, DR I Série-A, nº 98, pag 2366- 2372, 29 de Abril de 1991.

Lei nº 12/2005, “Informação genética e informação de saúde”, DR série I-A, nº 18, pag 606-611, de 26 de Janeiro de 2005.

Lei nº 28/94, DR I Série-A, nº 199, pag 5004- 5005, de 29 de Agosto de 1994.

Lei nº 67/98 “Lei da protecção de dados pessoais”, DR I Série A, nº 247, pag 5536-5546, de 26 de Outubro de 1998.

Lesseps dos Reis, “Aspectos éticos e deontológicos da medicina predizente”, Revista da FML, 4(2) 93-103, Março/Abril de 1999.

Lody R, Hart PE, Rajagopalan B, Taylor DJ, Crilley JG, Bradley JL, Blamire AM, Manners D, Styles P, Shapira AH, Cooper JM, “Antioxidant treatment improves in vivo cardiac and skeletal muscle bioenergetics in patients with Friedreich ataxia”, Ann Neurol; 49:590-6, 2001.

Lynch DR, Farmer JM, Balcer LJ, Wilson RB, “Friedreich ataxia: effects os genetic understanding on clinical evaluation and therapy”, Arch Neurol; 59:743-7, 2002.

Machkhas H, Bidichandani S, Patel P, Harati Y, “A mild case of Friedreich ataxia: lymphocyte and sural nerve analisys for GAA repeat length reveals somatic mosaicism, Muscle & Nerve, March 1998.

Mateo I, Llorca J, Volpini V, Corral J, Berciano J, Combarros O, “GAA expansion size and age at onset of Friedreich ataxia”, Neurology; 61:274-275, July 2003.

McCabe DJH, Ryan F, Moore DP, McQuaid S, King MD, Kelly A, Daly K, Barton DE, Murphy RP, “Typical Friedreich’s ataxia without GAA expansions and GAA expansions without typical Friedreich’s ataxia”, Journal of Neurology; 247:346-355, 2000.

McCabe LL, McCabe ER, “Genetic screening: carriers and affected individuals”; Annu Rev Genomics Genet; 5: 57-69, 2004.

Miller JM, Davis DC, “Routine screening for hemoglobinopathy in blacks”, *Md State Med J* ; 28(3):35, Mar 1979.

Montermini L, Andermman E, Labuda M, Richter A, Pandolfo M, Cvalcnati F, Pianese L, Iodice L, Farina G, Monticelli A, Turano M, Filla A, De Michelle G, Coccozza S, “The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles, *Human Molecular Genetics*; 6(8): 1261-1266, 1997.

Montermini L, Kish SJ, Jiralerspong S, Lamarche JB, Pandolfo M, “Somatic mosaicism for Friedreich ataxia GAA triplet repeat expansions in the central nervous system”, *Neurology*; 49:606-610, 1997.

Montermini L, Richter A, Morgan K, Justice CM, Julien D, Castellotti B, Mercier J, Poirier J, Capozzoli F, Bouchard JP, Lemieux B, Mathieu J, Vanasse M, Seni MH, Graham G, Andermann F, Andermann E, Melancon SB, Keats BJ, Di Donato S, Pandolfo M, “Phenotypic variability in Friedreich ataxia: role of the associated GAA triplet repeat expansion”, *Ann Neurology*; 41:675-682, 1997.

Morgan M et al, “Newsletter n° 13 spetial edition”, European federation of hereditary ataxia, august 1997.

Mukerji M, Choudhry S, Saleem Q, Padma MV, Maheshwari MC, Jain S, “Molecular analisys of Friedreich’s ataxia locus in the Indian population”, *Acta Neurol Scand*; 102(4) :227-9, Oct 2000.

Norgaard-Pedersen B, Simonsen H, “Biological specimen bank in neonatal screening”, *Acta Pediatr Suppl*, 432:106-9, 1999.

Nunes H, “Consentimento informado”,
<http://lusomundo.sapo.pt/xn90/435769.html>, Fev 2004.

Oliveira G, “Estrutura jurídica do acto médico, consentimento informado e responsabilidade médica”, Revista de Legislação e Jurisprudência, nº 3815, pag 33-34; nº 3816, pag 72-73; nº 3819, pag 167-170, Ano 125º, 1992/1993.

Oliveira G, “Implicações jurídicas do conhecimento do genoma” , Revista de Legislação e Jurisprudência, nº 3861, pag 361-363, Ano 128º, 1995/1996; nº 3862, pag 10-12; nº 3863, pag 35-46; nº 3864, pag 70-73, Ano 129º, 1996/1997.

Oliveira G, “O acesso dos menores a cuidados de Saúde”, Revista de Legislação e Jurisprudência, nº 3898, pag 16 –19, Ano 132º, 1999/2000.

Opinion of the **European Group on Ethics in Science and new Technologies to the European Commission**, “Ethical aspects of genetic testing in the workplace”,
http://europa.eu.int/comm/european_group_ethics/docs/, July 2003.

Osório RV, “Rastreio neonatal”, comunicação oral no Curso pós-graduado de Aconselhamento Genético em cuidados de saúde primários, Porto, 26-28 Outubro 2006.

Palau F, Espinós C, “Autosomal recessive cerebellar ataxias”, Orphanet Journal of Rare Diseases, 1: 47, November 2006.

Pena S, “A vida na era pós-genómica”, Jornal da ANBio (Associação Nacional de Biossegurança), RJ, Ano1, nº 5, Janeiro de 2002.

Pereira de Melo H, “O recurso a testes preditivos de doenças de manifestação tardia face ao direito a conhecer o património genético” , Brotéria, vol 144, 5/6, pag 545-557,1997.

Pianese L, Cavalcanti F, De Michele G, Filla A, Campanella G, Calabrese O, Castaldo I, Monticelli A, Coccozza S, “The effect of parental gender on the GAA dynamic mutation in de FRDA Gene”, *Am J Hum Genet*, 60:460-463, 1997.

Pinheiro MF, “Biologia Forense, Capítulo 2” (Aspectos Legais da aplicação da análise do DA aos casos forenses),– INML, Porto, 2002.

Projecto de Lei nº 28/IX: “Informação genética pessoal e informação de saúde” , proposto pelos deputados do Bloco de Esquerda, em Maio de 2002.

Projecto de Lei nº 455/VIII: “Informação genética pessoal” , proposto pelos deputados do Bloco de Esquerda, em Maio de 2001.

Puccio H, Simon D, Cossé M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindlang C, Matyas R, Rustin P, Koenig M, “Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits”, *Nature Genetics*, 27:181-186, Feb 2001.

Recomendação N°R(92)1 do Conselho da Europa, “Utilização das análises de ADN pelo sistema de justiça penal”, adoptado pelo Conselho de ministros a 10 Fev de 1992.

Recomendação N°R(92)3 do Conselho da Europa, “Testes e rastreios genéticos para fins médicos”, adoptado pelo Conselho de ministros a 10 Fev de 1992.

Recommendations of **European Society of Human Genetics**, ”Popuation genetic screening programmes: technical, social and ethical issues, <http://www.eshg.org>, 2000.

Report of the **Medical Research Council Working group** to develop operational and ethical guidelines, "Medical Research Council: Human tissue and biological samples for use in research", London: Medical research council, 1999.

Rockville MD, "National Bioethics Advisory Commission: Research involving human biological materials: ethical issues and policy guidance", August, 1999.

Rotig A, Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A, Rustin p, "Aconitase and mitochondrial iron-sulphur proteins deficiency in Friedreich ataxia", *Nature Genetics*;17:215-217, Oct 1997.

Rowley PT, "Genetic screening: marvel or menace?", *Science*, 225:138-(6), 1984.

Ryan F, "Best practice guidelines for molecular analysis of Friedreich ataxia", European Molecular Quality Network,
<http://www.emqn.org/emqn/BestPractice/mainColumnParagraphs/01/document/FRDA.pdf>, 2001.

Sangkitporn S, Chongkitivitya N, Pathompanichratana S, Sangkitpon SK, Songkharm B, Watanapocha U, Pathtong W, "Prevention of thalassemia: experiences from Samui Island", *J Med Assoc Thai*; 87(2):204-12, 2004.

Schultz JB, Dehmer T, Schols L, Mende H, Hardt C, Vorgerd M, Burk K, Matson W, Dichgans J, Beal MF, Bogdanov MB, "Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia", *Neurology*; 55:1719-21, 2000.

Sequeiros J, "O teste preditivo da Doença de Machado-Joseph", UnIGENE, IBMC, Porto, 1996.

Sharma R, Bhatti S, Gomez M, Clark R, Murray C, Ashizawa T, Bidichandani S, “The GAA triplet-repeat sequences in Friedreich ataxia shows a high level of somatic instability in vivo, with a significant predilection for large expansions”, *Human Molecular Genetics*; 11(18):2175-2187, 2002.

Skene L, Bankier A, “Retention of Guthrie cards: reassuring parents”, *Medicine Today*, 5 (2):68-71, Feb 2004.

Stracham T & Read A P, “Human Molecular Genetics ”, 3rd Edition, pag 117, 617, Garland Science, United States, 2004.

Therrell BL, Hannon WH, Pass KA, Lorey F, Broko C, Eckman J, Glass M, Heidenreic R, Kinney S, Kling S, Landanburger G, Meaney FJ, MacCabe ERB, Panny S, SchwartzM, Shapira E, “Guidelines for retention, storage and use of residual dried blood spot samples after newborn screening analysis: Statement of the council of regional Networks for genetic services”, *Biochemical and Molecular Medicine*, 57:116-124, 1996.

Tozzi G, Nuccetelli M, Lo Bello M, Bernardini S, Bellicampi L, Ballerini S, Gaeta LM, Casali C, Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F, “Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich ataxia”, *Arch Dis Child*; 86:376-9, 2002.

Vallance H, Ford J, ”Carrier Testing for autossomal-recessive disorder”, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*; 40(4):473-497, 2003.

Vetcher A, Napierala M, Iyer R, Chastain P, Griffith J, Wells R, “Sticky DNA, a long GAA.GAA.TTC Triplex that id formed intramolecularly, in the sequence og intron 1 of the frataxin gene”, *The journal of biological Chemistry*; 227(42):39217-39227, 2002.

World Health Organization, Human genetics programme, “Proposed international guidelines on Ethical issues in medical genetics and genetic services”, 1998.

8.1 Bibliografia adicional

Borry P, Fryns JP, Schotsmans P, Dierickx K, “Carrier testing in minors: a systematic review of guidelines and position papers”, *European Journal of Human Genetics*; 14:133-138, 2004.

Deschênes M, Sallée C, “Accountability in population Biobanking: comparative approaches”, *Journal of Law, Medicine and Ethics*, 40-53, spring 2005.

Chantrel-Groussard K, Geromel V, Puccio H, Koenig M, Munnich A, Rotig A, Rustin P, “Disable early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich’s ataxia”, *Human Molecular Genetics*; 10(19):2061-2067, 2001.

Greely HT, “Informed consent and other ethical issues in human population genetics”, *Annu.Rev.Genet.*; 35:785-800, 2001.

Kaplan J, “Friedreich ataxia is a mitochondrial disorder”, *Proc.Natl.Acad. Sci*; 96:10948-10949, September 1998.

Karthikeyan G, Santos JH, Graziewicz MA, Copeland WC, Isaya G, Houten BV, Resnick MA, “Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage”, *Human Molecular Genetics*; 12(24):3331-3342, 2003.

Mahowald MB, Verp MS, Anderson RR, “Genetic counselling:clinical and ethical challenges”, *Annu. Rev. Genet.*;32:547-59, 1998.

Mandl KD, Feit S, Larson C, Kohane IS, “Newborn screening program practices in the United States: Notification, research, and Consent”, *Pediatrics*; 109(2):269-273, February 2002.

Mannhalter C, “Collection, Storage and use of Genetic Data, Universal Declaration of the Human Genome and Human rights: present status- Future perspectives”, Zagreb 12-14 Jun, 2003.

McEwen JE, Reilly PR, “Stored guthrie cards as DNA«banks»”, *American Journal of Human Genetics*; 55:196-200, 1994.

Meslin EM, Quaid KA, “Ethical issues in the collection, storage, and research use of human biological materials”, *J Lab Clin Med*; 144(5):229-234, November 2004.

Pandolfo M, “Iron Metabolism and mitochondrial abnormalities in Friedreich ataxia”, *Blood cells, Molecules and diseases*; 29(3):536-547, Nov/Dec 2002.

Puccio H, Koenig M, “Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia”, *Human Molecular Genetics*; 9(6):887-892, 2000.

Resolução da Assembleia da República nº 47/2001, “Medidas de protecção da dignidade pessoal e identidade genética do ser humano”, de 12 de Julho de 2001.

Resolução da Assembleia da República nº 48/2001, “Defesa e salvaguarda da informação genética pessoal”, de 12 de Julho de 2001.

Sharma R, De Biase I, Gomez M, Delatycki MB, Ashizawa T, Bidichandani SI, “Friedreich ataxia in carriers of unstable borderline GAA triplet repeat alleles”, *Annals of Neurology*; 56(6):898-901, December 2004.

Tan G, Chen LS, Lonnerdal B, Gellera C, Taroni FA, Cortopassi GA, “Frataxin expression rescues mitochondrial dysfunctions in FRDA cells”, Human Molecular Genetics;10(19):2099-2107, 2001.

Wertz DC, “Archived specimens:a plataform for discussion”, Community genetics; 2:51-60, 1999.

9. Apresentação de trabalho



**EUROPEAN
HUMAN GENETICS
CONFERENCE 2006**
Amsterdam, The Netherlands,
May 6-9, 2006

Apresentação em poster

Publicação do resumo : “*European Journal of Human Genetics*”; volume 14 (supl 1): 302, Maio de 2006.

Resumo/Abstract:

Frequency of carriers for Friedreich ataxia in the Portuguese population

Joana Cerqueira¹, Eduardo Cruz¹, Jorge Sequeiros^{1,2}

¹Center for Predictive and Preventive Genetics (CGPP), IBMC, Porto, Portugal

²ICBAS, Univ Porto, Portugal

Friedreich ataxia (FRDA) is a neurological disorder, caused by a large GAA repeat in intron 1 of the *FRDA* gene. FRDA is the most common early-onset recessive ataxia in Caucasian populations. Its prevalence was estimated to be around 1:25,000-1:50,000, while the estimated frequency of carriers is 1:60-1:120 in most Indo-European populations.

We followed an affected family for genetic counselling and cascade-testing, through which 3 expansion carriers were found in the general population (spouses). This prompted us to study the frequency of carriers in the Portuguese population, in anonymized Guthrie cards from IGM (Medical Genetics Institute, Porto; courtesy of Dr. Maximina Pinto).

We have thus analyzed 1059 blood spots (529 females, 530 males), uniformly distributed by the 20 districts of Portugal, according their population density. DNA was extracted quantified and tested for the *FRDA* (GAA)_n expansion, by PCR, electrophoresis and Southern blotting.

A total of 2118 alleles were sized for their GAA repeat. Small normal alleles (<12 GAA) represented 94,2% and large normal alleles (12-33 GAAs) 5,1%. We found 10 expansion carriers (66 –1700 GAAs), with an aleatory geographic distribution, as well as 3 pre-mutation carriers (34 – 65 GAAs). Carrier frequency was estimated to be 1:106. This is in agreement with values mentioned in the literature for other European populations. This information will be important to foresee the needs for testing and do better risk estimates in counselling of families affected.