

SOLICITAÇÃO	PACIENTE	MATERIAL
Nome: Dr(a). Marcela C. Machado Costa	Nome: Rodrigo Pereira Regis	Responsável pela coleta: Singular Medicina de Precisão
Instituição: SER da Bahia	Data de Nascimento: 27.03.1985	Tipo: DNA extraído de sangue total
Cidade: Salvador	Gênero: Masculino	Nº de Identificação: 441
Telefone: (71) 3022-9886		Data da coleta: 22.01.2021
		Data do resultado: 20.04.2021

Resultado do Exame: EXOMA CLÍNICO - SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

COMPREENDENDO O TESTE GENÉTICO

Genoma é o conteúdo genético ou a informação hereditária de um organismo, codificada no DNA. O DNA é formado por uma dupla fita composta por nucleotídeos (base nitrogenada, açúcar e fosfato) e as bases nitrogenadas são designadas: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) e Citosina (C). O genoma, constituído por cerca de 3 bilhões de pares de base, é quase o mesmo em todos os indivíduos, porém com pequenas diferenças denominadas variações genéticas. Estas variações são responsáveis pelas diferenças das características fenotípicas entre as pessoas, como por exemplo: o tipo do cabelo, cor dos olhos, e também, por diferenças nas condições de saúde de cada ser humano.

A variante de nucleotídeo único (SNV – *Single Nucleotide Variant*) é um tipo de mutação, onde, por exemplo, uma única troca da base do nucleotídeo, ou “uma letra” (A, T, G, C) ocorre na sequência do DNA de um indivíduo comparado a outros e esta variação pode ser responsável por uma variação no fenótipo, ou seja, características próprias do indivíduo ou por uma doença.

Exemplo: Sequência 1: -AGCCTAATGGGC-
Sequência 2: -AGCCTAAGGGGC-

Neste exemplo, a sequência 1 difere da 2 em apenas uma “letra”, mas que pode interferir no fenótipo, como: na susceptibilidade pra determinada doença, resistência a fármacos, fatores de risco à exposições ambientais, etc...

No genoma existem regiões que são funcionalmente importantes responsáveis pela produção de proteínas que atuam no organismo, chamadas de exons. E existem regiões que não são traduzidas, denominadas de introns. O sequenciamento do Exoma é um exame que avalia todos os exons presentes no Genoma, entretanto o direcionamento da análise é principalmente para os genes previamente associados aos quadros clínicos descritos na solicitação do exame. O exoma compreende 1-2% do genoma humano, e contém cerca de 85% das mutações que estão associadas a várias doenças. Já o sequenciamento do Genoma consiste na avaliação tanto dos exons como dos introns. O sequenciamento completo do Genoma analisa os exons e introns e compara as variações encontradas com uma sequência padrão de pessoas saudáveis descritos em bancos de dados para identificar as variações (mutações) que causam a doença. Variações nas sequências dos introns podem interferir na expressão dos exons.

Classificação das Variantes

As variações são classificadas de acordo com orientações do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG)¹ e baseada em informações de bancos de dados como o ClinVar²:

Benigna	Variante previamente conhecida e não associada à doença
Provavelmente Benigna	Variante com alta probabilidade de não estar associada à doença
Variante de Significado Incerto (VUS)*	Variante de significado incerto em relação à associação à doença
Provavelmente Patogênica	Variante com alta probabilidade de estar associada à doença
Patogênica	Variante previamente reconhecida como responsável pela doença

*VUS – *Variant of Uncertain Significance*

INFORMAÇÕES CLÍNICAS

O paciente Rodrigo Pereira Regis, filho de pais não consanguíneos, apresenta quadro clínico de neuropatia motora sensitiva à pressão, lesão ulnar bilateral com sinais de compressão ao nível do cotovelo, malformação óssea à esquerda e escoliose por hemivértebra torácica. Foi avaliado quanto a variações patogênicas.

RESULTADO

NÃO FORAM IDENTIFICADAS VARIANTES PATOGÊNICAS OU PROVAVELMENTE PATOGÊNICAS ASSOCIADAS AO FENÓTIPO RELATADO

Achados Adicionais

FOI IDENTIFICADA UMA VARIANTE PATOGÊNICA

Gene/Transcrito	Localização	Variantes	Zigosidade	Doença OMIM	Herança	Classificação da variante
HEXA (-) (ENST00000566304.5)	Intron 7	c.838+1G>C (<i>Splice variant</i>)	Heterozigose	Doença de Tay-Sachs	Autossômica Recessiva	Patogênica

Os resultados dos testes genéticos são relatados de acordo com as recomendações do *American College of Medical Genetics*¹.

Nenhuma outra variante que merece ser relatada foi detectada. Variantes com altas frequências alélicas que são provavelmente benignas serão fornecidas mediante solicitação.

INTERPRETAÇÃO DA VARIANTE E CORRELAÇÃO CLÍNICA

Descrição da variante: Foi identificada uma variante no sítio 5' de *splicing* do Intron 7 no gene **HEXA** (**chr15:g.72350517C>G; profundidade 145x**) que afeta os nucleotídeos invariantes GT no sítio doador de *splicing* do exon 7 (**c.838+1G>C; ENST00000566304.5**). Uma alteração diferente de nucleotídeos na mesma posição (c.838 + 1G> A) foi relatada, em heterozigose composta, em pacientes afetados com doença de Tay-Sachs³. Esta variante já está relatada no ClinVar como patogênica, associada a doença de Tay-Sachs. Tem menor frequência alélica (MAF) de 0,002% no gnomAD⁴ e não foi reportada no AbraOM⁵ nem no 1000 genomes⁶. As predições[#] *in silico* classificaram a variante como “prejudicial” pelo algoritmo MutationTaster2. O referido códon é conservado em todas as espécies.

Fenótipo OMIM: A doença de Tay-Sachs (**OMIM#272800**) é causada por mutações em homozigose ou heterozigose composta no gene **HEXA (OMIM*606869)**. Essa é uma doença neurodegenerativa progressiva que, na forma infantil clássica, é geralmente fatal aos 2 ou 3 anos de idade⁷. Nas formas mais tardias apresenta fenótipos variados, incluindo doença progressiva do neurônio motor, distonia, degeneração espinocerebelar. As funções cognitivas, como a fala, podem ser afetadas numa fase mais tardia da doença. Alterações psiquiátricas são muito comuns entre os adultos com doença de Tay Sachs¹⁹.

Neste teste, não foi detectada uma segunda variante relevante em heterozigose no gene HEXA. A sensibilidade dos ensaios baseados em NGS para detectar grandes deleções/duplicações em heterozigose é baixa e um método alternativo é recomendado.

Baseado nas evidências acima, **esta variante do gene HEXA é classificada como uma variante patogênica e deve ser cuidadosamente correlacionada com os sintomas clínicos.**

O significado/classificação das variantes pode mudar com base em testes genéticos nos pais e outros membros da família.

RECOMENDAÇÕES

Aconselhamento genético é recomendado.

Se os resultados obtidos não corresponderem aos achados clínicos, testes adicionais devem ser considerados conforme as recomendações do médico assistente.

LIMITAÇÕES

O teste genético é uma parte importante do processo diagnóstico. No entanto, os testes genéticos nem sempre dão uma resposta definitiva. Em alguns casos, o teste pode não identificar uma variante genética, mesmo que exista. Isso pode ser devido a limitações no conhecimento médico atual ou na tecnologia de teste. A precisa interpretação dos resultados dos testes pode exigir o conhecimento das verdadeiras relações biológicas em uma família. Não declarar com precisão as relações biológicas na família pode resultar em interpretação incorreta dos resultados, diagnósticos incorretos e/ou resultados de testes inconclusivos.

Os resultados dos testes são interpretados no contexto de achados clínicos, histórico familiar e outros dados laboratoriais. Apenas variações nos genes potencialmente relacionados à condição médica do probando são relatadas. Polimorfismos raros podem levar a resultados falsos negativos ou falsos positivos. A interpretação incorreta dos resultados pode ocorrer se as informações fornecidas forem imprecisas ou incompletas. Eventos específicos, como translocações, expansões repetidas e rearranjos cromossômicos, podem não ser detectados com confiabilidade com o sequenciamento de exoma clínico direcionado. A sensibilidade deste teste para detectar grandes deleções/duplicações de mais de 10pb ou variações no número de cópias (CNV) é de 70 a 75%. As CNVs detectadas devem ser confirmadas por método alternativo. Variantes na região não traduzida, promotores e variantes intrônicas não são avaliadas usando este método.

O teste genético é altamente preciso. Raramente, resultados imprecisos podem ocorrer por vários motivos. Esses motivos incluem, mas não se limitam a: amostragens erradas; relatórios imprecisos de informações clínicas/médicas; erros técnicos raros ou circunstâncias incomuns, como transplante de medula óssea, transfusão de sangue; ou a presença de alterações em uma porcentagem tão pequena de células que podem não ser detectáveis pelo teste (por exemplo, mosaicismo).

As frequências alélicas das variantes e as predições *in silico* para a versão GRCh38 do genoma humano são obtidas utilizando as coordenadas do genoma hg19. As frequências dos alelos populacionais existentes (1000 Genome, ExAC, gnomAD-Exome) atualmente estão disponíveis apenas para a versão do genoma hg19. Isso pode resultar em algumas discrepâncias na anotação de variantes devido às mudanças complexas em algumas regiões do genoma.

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE

A interpretação das variantes descritas neste relatório foi realizada com base no conhecimento atual, isto é, nas informações disponíveis no momento da elaboração do mesmo. A classificação das variantes pode mudar com o tempo e a Singular Medicina de Precisão não pode ser responsabilizada por isso. Não hesite em entrar em contato com a Singular Medicina de Precisão (contato@singularmp.com.br) no futuro para verificar se houve alguma alteração na classificação de quaisquer variantes. A reanálise de variantes em relatórios emitidos anteriormente, à luz de novas evidências, não é realizada rotineiramente, mas pode estar disponível mediante solicitação.

Também é possível que uma variante patogênica esteja presente em um gene que não foi selecionado para análise e/ou interpretação devido a informações fenotípicas disponíveis serem insuficientes.

Genes com pseudogenes, genes parálogos e genes com baixa complexidade podem ter sensibilidade e especificidade diminuídas na detecção e interpretação de variantes, devido à incapacidade das ferramentas de análise de dados para determinar inequivocamente a origem dos dados de sequência nessas regiões.

Descobertas incidentais ou secundárias (se houver) que atendem às diretrizes da ACMG¹ podem ser fornecidas mediante solicitação. O relatório deve ser gerado dentro do tempo previsto, no entanto, esse tempo pode variar dependendo da complexidade dos testes solicitados. A Singular Medicina de Precisão sob nenhuma circunstância será responsável por qualquer atraso, além do tempo previsto do resultado mencionado.

Fica esclarecido que os relatórios gerados a partir dos testes não fornecem nenhum diagnóstico ou opinião ou recomendam qualquer forma de conduta. A Singular Medicina de Precisão recomenda que o paciente e/ou seus responsáveis, conforme o caso, procurem o médico assistente ou um médico geneticista, para interpretar os relatórios gerados. A Singular Medicina de Precisão, por meio deste documento, se isenta de qualquer responsabilidade decorrente da conduta médica relacionada à interpretação dos resultados.

Informamos ainda que, nos casos em que a coleta da amostra biológica não for realizada pela Singular Medicina de Precisão, esta não pode ser responsabilizada por troca de amostras, resultados incompletos,

incorretos ou enganados de qualquer análise. "Informamos ainda que a coleta da amostra biológica não foi realizada pela Singular Medicina de Precisão. Nestes casos, a Singular Medicina de Precisão não pode ser responsabilizada por troca de amostras, resultados incompletos, incorretos ou enganados de qualquer análise, caso o problema não possa ser identificado pela Singular Medicina de Precisão com antecedência.

A Singular Medicina de Precisão tem como parceiros laboratórios internacionais com certificação de alto e atualizados padrões de qualidade para a realização das análises genéticas. A coleta, preparação e envio das amostras à Singular Medicina de Precisão são orientadas visando à manutenção da qualidade da análise do exame. No entanto, em raros casos, as análises genéticas podem não ser consistentes com um resultado correto; como por exemplo, por causa da qualidade do material enviado ou por falhas imprevisíveis ou desconhecidas ocorridas nos laboratórios parceiros, e que não podem ser determinadas antecipadamente. Nestes casos, a Singular Medicina de Precisão não pode ser responsabilizada por resultados incompletos, incorretos ou enganados de qualquer análise, caso o problema não possa ser identificado pela Singular Medicina de Precisão com antecedência. Este é um teste desenvolvido em laboratório parceiro da Singular Medicina de Precisão certificado pelo CAP (*College of American Pathologists*).

METODOLOGIA

Sequenciamento gênico direcionado: Foram realizados a captura e sequenciamento seletivo das regiões codificadoras de proteínas do genoma/genes. Mutações identificadas nas regiões exônicas são geralmente acionáveis quando comparadas com as variações que ocorrem nas regiões não codificantes. O sequenciamento direcionado representa uma abordagem econômica para detectar variantes presentes em múltiplos genes em um indivíduo.

O DNA extraído sangue foi usado para realizar a captura de genes direcionados usando um kit de captura personalizado. As bibliotecas foram sequenciadas para obter cobertura > 80-100X na plataforma de sequenciamento Illumina. Seguimos a estrutura de boas práticas do GATK para identificação de variantes na amostra usando o Sentieon⁸ (v201808.07). As sequências obtidas foram alinhadas ao genoma de referência humano (GRCh38.p13) usando o alinhador Sentieon^{8,9} e foram analisadas utilizando o Sentieon para remover duplicatas, recalibração e realinhamento de indels. O Sentieon haplotypcaller foi usado para identificar variantes relevantes para a suspeita clínica. A anotação genética das variantes é realizada usando o programa VEP¹⁰ contra o modelo de gene humano do Ensemble¹¹ release 99. Além dos SNVs e pequenos Indels, as variantes do número de cópias (CNVs) são detectadas a partir dos dados da sequência alvo, usando o método ExomeDepth¹² (v1.1.10). Esse algoritmo detecta CNVs raras com base na comparação das profundidades de leitura dos dados de teste com o conjunto de dados de referência agregado correspondente.

Mutações clinicamente relevantes foram anotadas usando variantes publicadas na literatura e um conjunto de bancos de dados de doenças - ClinVar, OMIM (atualizado em 11 de Maio de 2020), GWAS, HGMD (v2020.2) e SwissVar^{2,13-16}. As variantes comuns são filtradas com base na frequência do alelo no 1000Genome Phase 3, gnomAD (v2.1), EVS, dbSNP (v151), 1000 Japanese Genome e o Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM)^{4,6,17,18}. O efeito de variantes não sinônimos é calculado usando vários

algoritmos, como PolyPhen-2, SIFT, MutationTaster2 e LRT. Apenas variantes não sinônimas e do sítio de splice encontradas nas regiões codificantes foram utilizadas para interpretação clínica. Não foram relatadas variantes silenciosas que não resulta na troca de aminoácidos em regiões codificantes.

As predições *in-silico* são baseadas no *Variant Effect Predictor*, Ensembl versão 99 (SIFT versão - 5.2.2; PolyPhen - 2.2.2), dbNSFPv4.0 (LRT versão - 5 de dezembro de 2019) e *MutationTaster2* (MT2). As predições do *MutationTaster2* são baseadas na construção NCBI/Ensembl 66 (as coordenadas genômicas GRCh38 são convertidas para hg19 usando UCSC LiftOver e mapeadas para MT2).

Tabela - Parâmetros de qualidade de sequenciamento

Total de dados gerados (Gb)	9,78
Total de sequencias alinhadas (%)	99,96
Sequencias com bom alinhamento (%)	90,56
Dados ≥Q30 (%)	95,44

REFERÊNCIAS

1. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–424 (2015).
2. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1062–D1067 (2018).
3. Hechtman P. *et al.*, The intron 7 donor splice site transition: a second Tay-Sachs disease mutation in French Canada. *Hum. Genet.*, 0340-6717, 1992.
4. Karczewski, K. J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **581**, 434–443 (2020).
5. Naslavsky, M. S. *et al.* Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum. Mutat.* **38**, 751–763 (2017).
6. Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* vol. 526 68–74 (2015).
7. Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Schiettecatte, F., Scott, A. F. & Hamosh, A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an Online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* **43**, D789–D798 (2015).
8. Freed, D., Aldana, R., Weber, J. A. & Edwards, J. S. The Sentieon Genomics Tools - A fast and accurate solution to variant calling from next-generation sequence data. *bioRxiv* 115717 (2017) doi:10.1101/115717.
9. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
10. McLaren, W. *et al.* Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* **26**, 2069–2070 (2010).
11. Zerbino, D. R. *et al.* Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D754–D761 (2018).
12. Plagnol, V. *et al.* A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics* **28**, 2747–2754 (2012).
13. Franke, A. *et al.* Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn’s disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 1118–1125 (2010).
14. Stenson, P. D. *et al.* The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Human Genetics* vol. 136 665–677 (2017).
15. Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**, 275–282 (1992).
16. Mottaz, A., David, F. P. A., Veuthey, A. L. & Yip, Y. L. Easy retrieval of single amino-acid polymorphisms and phenotype information using SwissVar. *Bioinformatics* **26**, 851–852 (2010).
17. Exome Variant Server. <https://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
18. Sherry, S. T., Ward, M. & Sirotkin, K. dbSNP - database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Research* vol. 9 677–679 (1999).
19. Toro C, Shirvan L, Tift C. HEXA Disorders. 1999 Mar 11 [Updated 2020 Oct 1]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1218/>



Drª Kiyoko Abe Sandes
Bióloga
CRBio – 05.594/08D
Responsável Técnica



Drª Paula Brito Corrêa
Biomédica
CRBM – 1979

APÊNDICE

Todos os genes cobertos pelo Exoma Clínico foram selecionados e analisados para as indicações clínicas fornecidas. A cobertura de genes críticos é fornecida na tabela abaixo; no entanto, a cobertura de todos os genes do Exoma Clínico será fornecida mediante solicitação.

Tabela - Cobertura de genes críticos analisados.

Gene	Percentagem de cobertura da região codificante	Gene	Percentagem de cobertura da região codificante	Gene	Percentagem de cobertura da região codificante
AARS1	100.00	AIFM1	100.00	ATL1	100.00
ATL3	100.00	CCT5	100.00	COX6A1	100.00
CTDP1	100.00	DHTKD1	100.00	DNAJB2	100.00
DNM2	100.00	DNMT1	99.79	DST	100.00
DYNC1H1	100.00	EGR2	100.00	FGD4	99.90
FIG4	100.00	GAN	100.00	GDAP1	100.00
GJB1	100.00	GNB4	100.00	HEXA	100.00
HINT1	100.00	HK1	100.00	HOOK1	100.00
HOXD10	100.00	HSPB1	100.00	HSPB8	100.00
IGHMBP2	100.00	INF2	100.00	JPH1	100.00
KIF1A	100.00	KIF1B	100.00	KIF5A	100.00
LITAF	100.00	LMNA	100.00	LRSAM1	100.00
MARS	100.00	MED25	100.00	MFN2	100.00
MME	97.99	MORC2	100.00	MPZ	100.00
MTMR2	100.00	NAGLU	100.00	NDRG1	100.00
NEFH	100.00	NEFL	100.00	NGF	100.00
NTRK1	100.00	PKD3	100.00	PLEKHG5	100.00
PMP22	100.00	PRDM12	100.00	PRPS1	100.00
PRX	100.00	RAB7A	100.00	REEP1	100.00
RETREG1	100.00	SBF1	100.00	SBF2	100.00
SCN11A	100.00	SCN9A	100.00	SH3TC2	100.00
SLC12A6	100.00	SLC25A46	100.00	SOX10	100.00

Gene	Percentagem de cobertura da região codificante	Gene	Percentagem de cobertura da região codificante	Gene	Percentagem de cobertura da região codificante
<i>SPG11</i>	100.00	<i>SPTLC1</i>	100.00	<i>SPTLC2</i>	100.00
<i>SURF1</i>	100.00	<i>TFG</i>	100.00	<i>TRIM2</i>	94.21
<i>TRPV4</i>	100.00	<i>TTR</i>	100.00	<i>VCP</i>	100.00
<i>WNK1</i>	100.00	<i>YARS1</i>	100.00		