

SOLICITAÇÃO	PACIENTE	MATERIAL
Nome: Dr. Olavo Siqueira CRM: 17652 - ES Instituição: HINSG Cidade: Vitória - ES	Nome: Maria Luiza Zatta Martins Data de Nascimento: 04.12.2015	Responsável pela coleta: HISNG Tipo: DNA extraído de Sangue Periférico Nº de Identificação: 964/22 Data da coleta: 31.05.2022 Data do resultado: 22.07.2022

Resultado do Exame: PAINEL PARA DISPLASIAS ESQUELÉTICAS – 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.

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

Rizomelia, anormalidade epifisária, osteopenia e deformidades ósseas nos quadris, cotovelos e punhos. Tem suspeita de displasia esquelética.

RESULTADO

FOI IDENTIFICADA UMA VARIANTE DE SIGNIFICADO INCERTO (VUS) QUE PODE ESTAR RELACIONADA AO FENÓTIPO RELATADO

Gene/Transcrito	Localização	Variante	Zigossidade	Doença OMIM	Herança	Classificação da variante
LMX1B (+) (ENST00000355497.10)	Exon 8	c.1166T>A (p.Val389Glu)	heterozigose	Síndrome unha-patela	Autossômica dominante	Significado incerto

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.

Todos os genes cobertos pelo painel foram analisados para as indicações clínicas fornecidas. A cobertura dos genes está no Apendice.

INTERPRETAÇÃO DAS VARIANTES E CORRELAÇÃO CLÍNICA

Variante (gene *LMX1B*)

Descrição da variante: Foi identificada uma variante *missense*, em heterozigose no exon 8 do gene ***LMX1B*** (chr9:g.126696396T>A; c.1166T>A; **Profundidade: 239x**) que resulta na substituição do aminoácido Valina por Glutamina no códon 389 (**p.Val389Glu**; ENST00000355497.10) (Tabela). A variante **p.Val389Glu** não foi relatada nos bancos de dados gnomAD³, AbraOM⁴ e no 1000 genomes⁵. As predições *in silico* da variante são “possivelmente prejudiciais” por PolyPhen-2 (HumDiv), “prejudiciais” por SIFT, LRT e MutationTaster2. O códon de referência é conservado em outras espécies.

Fenótipo OMIM: A Síndrome Unha-Patela (**OMIM#161200**) é causada por mutações em heterozigose no gene ***LMX1B*** (**OMIM*602575**). Esta condição clínica é caracterizada por defeitos do desenvolvimento das estruturas dos membros, do rim e dos olhos, manifestados por displasia ungueal, anormalidades patelares, displasia dos cotovelos, ilíacos, nefropatia e glaucoma, respectivamente [6].

Devido à correspondência fenotípica parcial e à falta de evidência na literatura, **esta variante no gene *LMX1B* é classificada como uma variante de significado incerto 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. 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.

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.

As mutações não foram validadas/confirmadas pelo sequenciamento de Sanger.

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.

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. 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 do sangue periférico 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 Sentieon⁷ (v201808.07). As sequências obtidas foram alinhadas ao genoma de referência humano (GRCh38.p13) usando o alinhador Sentieon^{7,8} 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 VEP⁹ contra o modelo de gene humano do Ensemble¹⁰ 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 ExomeDepth¹¹ (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^{2,6,12-15}. 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)^{4-6,16,17}. 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 *splicing* encontradas nas regiões codificantes foram utilizadas para interpretação clínica. Não foram relatadas variantes silenciosas que não resulta na troca de aminoácidos em regiões codificantes.

Tabela - Parâmetros de qualidade de sequenciamento

Total de dados gerados (Gb)	10,00
Total de sequências alinhadas (%)	99,98
Sequências com bom alinhamento (%)	94,57
Dados ≥Q30 (%)	96,82

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. Karczewski, K. J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **581**, 434–443 (2020).
4. Naslavsky, M. S. *et al.* Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum. Mutat.* **38**, 751–763 (2017).
5. Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* vol. 526 68–74 (2015).
6. 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).
7. 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.
8. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
9. McLaren, W. *et al.* Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* **26**, 2069–2070 (2010).
10. Zerbino, D. R. *et al.* Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D754–D761 (2018).
11. 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).
12. 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).
13. Buniello A. *et al.* The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Research*, 2019, Vol. 47 (Database issue): D1005–D1012
14. 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).
15. 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).
16. Exome Variant Server. <https://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
17. 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).
18. Meyer, L. R. *et al.* The UCSC Genome Browser database: Extensions and updates 2013. *Nucleic Acids Res.* **41**, (2013).
19. McKenna, A. *et al.* The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
20. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
21. WebHome < MITOMAP < Foswiki. <https://www.mitomap.org/MITOMAP>.



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



Drª Paula Brito Corrêa
Biomédica
CRBM - 1979



Dr Leandro Benevides
Biomédico Geneticista
CRBM - 12025

APÊNDICE

Tabela - Cobertura de genes analisados.

Gene	Cobertura %	Gene	Cobertura %	Gene	Cobertura %
ACAN	86.47	ACP5	100.00	ACVR1	100.00
ADAMTSL2	100.00	ADAMTSL2	100.00	AGPS	100.00
ALPL	100.00	ALX3	100.00	ALX4	100.00
AMER1	100.00	ANKH	100.00	ANO5	98.28
AP2S1	100.00	ARHGAP31	100.00	ATP6V0A2	100.00
ATR	100.00	B3GALT6	89.56	B4GALT7	100.00
BHLHA9	100.00	BMP1	100.00	BMP2	100.00
BMPER	100.00	BMPR1B	100.00	BPNT2	100.00
CA2	100.00	CANT1	100.00	CASR	100.00
CC2D2A	100.00	CCDC8	100.00	CCN6	100.00
CCNQ	100.00	CDC6	100.00	CDH15	100.00
CDH3	100.00	CDKN1C	100.00	CDT1	100.00
CENPJ	100.00	CEP152	100.00	CEP290	98.59
CEP63	100.00	CHST14	100.00	CHST3	100.00
CHSY1	100.00	CILK1	100.00	CLCN5	100.00
CLCN7	100.00	COL10A1	100.00	COL11A1	100.00
COL11A2	100.00	COL1A1	100.00	COL1A2	99.59
COL2A1	100.00	COL9A1	100.00	COL9A2	100.00
COL9A3	100.00	COMP	100.00	CREBBP	100.00
CRTAP	100.00	CTSK	100.00	CUL7	100.00
CYP27B1	100.00	CYP2R1	100.00	DDR2	100.00
DHCR24	100.00	DHCR7	100.00	DLL3	100.00
DLX3	100.00	DMP1	100.00	DNA2	100.00
DVL1	100.00	DVL3	100.00	DYM	100.00
DYNC2H1	100.00	EBP	100.00	EFNB1	100.00
EIF2AK3	100.00	ENPP1	100.00	EP300	100.00
ERF	100.00	ESCO2	100.00	EVC	97.04
EVC2	100.00	EXT1	100.00	EXT2	100.00
EZH1	100.00	EZH2	100.00	FAM111A	100.00
FAM20C	100.00	FBLN1	100.00	FBN1	100.00
FERMT3	100.00	FGF10	100.00	FGF16	100.00
FGF23	100.00	FGF9	100.00	FGFR1	100.00
FGFR2	100.00	FGFR3	100.00	FKBP10	100.00
FLNA	100.00	FLNB	100.00	FREM1	100.00
GALNT3	100.00	GDF3	100.00	GDF5	100.00
GDF6	100.00	GJA1	100.00	GLB1	100.00
GLI3	100.00	GNA11	100.00	GNAS	100.00
GNPAT	100.00	GORAB	100.00	GPC6	100.00
GSC	100.00	HDAC4	100.00	HES7	100.00
HOXA11	100.00	HOXD13	100.00	HPGD	100.00
HSPG2	100.00	IARS2	100.00	IFITM5	100.00
IFT122	100.00	IFT140	100.00	IFT172	100.00
IFT43	100.00	IFT80	100.00	IHH	100.00
IL11RA	100.00	INPPL1	100.00	KIF22	100.00

Gene	Cobertura %	Gene	Cobertura %	Gene	Cobertura %
<i>KIF7</i>	100.00	<i>LARP7</i>	100.00	<i>LBR</i>	100.00
<i>LEMD3</i>	100.00	<i>LFNG</i>	87.77	<i>LIFR</i>	100.00
<i>LMBR1</i>	95.31	<i>LMNA</i>	100.00	<i>LMX1B</i>	100.00
<i>LRP4</i>	100.00	<i>LRP5</i>	100.00	<i>MAFB</i>	100.00
<i>MATN3</i>	100.00	<i>MEGF8</i>	100.00	<i>MEOX1</i>	100.00
<i>MESP2</i>	100.00	<i>MGP</i>	89.32	<i>MKS1</i>	100.00
<i>MMP13</i>	100.00	<i>MMP2</i>	100.00	<i>MMP9</i>	100.00
<i>MSX2</i>	100.00	<i>MTAP</i>	100.00	<i>MYCN</i>	100.00