

SOLICITAÇÃO	PACIENTE	MATERIAL
Nome: Dr Olavo Siqueira	Nome: Samuel Santos Fernandes	Responsável pela coleta: Hospital Infantil N S da Glória
CRM: ES 17652	Data de Nascimento: 21.06.2021	Tipo: DNA extraído de Sangue Periférico
Instituição: HINSG		Nº de Identificação: 981/22
Cidade: Vitória - ES		Data da coleta: 07.06.2022
		Data do resultado: 28.07.2022

Resultado do Exame: Análise dos genes *TCOF1, POLR1B, POLR1C, POLR1D* – 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

Apresenta atraso do desenvolvimento, hipertelorismo, microtia, pitz pré-auricular, retrognatia, hipoplasia malar, hiperplasia do osso nasal, aumento de columela nasal, hipoplasia de cílios em terço proximal da pálpebra inferior, aumento de base e raiz nasal ausência de coloboma. Irmão com fenótipo semelhante. Tem suspeita clínica da síndrome de Treacher-Collins.

RESULTADO

FOI IDENTIFICADA UMA VARIANTE PROVAVELMENTE PATOGENICA RELACIONADA AO FENÓTIPO RELATADO

Gene/Transcrito	Localização	Variante	Doença OMIM	Herança	Zigossidade	Classificação da variante
POLR1D (+) (ENST00000302979.4)	Exons 1 e 2	chr13:g.(?_27621243)_ (27623551_?)del [Deleção de éxons]	Síndrome de Treacher Collins 2	Autossômica dominante	Heterozigose	Provavelmente patogênica

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

Todos os genes solicitados foram analisados e a cobertura dos mesmos serão liberados mediante solicitação.

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

VARIANTE (gene *POLR1D*):

Descrição da variante: Na análise de CNV *in silico*, foi detectada uma deleção em heterozigose contígua de tamanho (~1,27 Kb), abrangendo a localização genômica **chr13:g.(?_27621243)_ (27623551_?)del** que engloba os exons 1 e 2 do gene *POLR1D*. A cobertura e a profundidade dessas regiões alvo foram suficiente neste ensaio e, portanto, os resultados provavelmente são sugestivos de deleção em heterozigose dessa região [razão CNV: 0,53]. Deleções de novo no gene *POLR1D* já foram previamente relatadas em pacientes afetados pela síndrome de Treacher-Collins [18].

Fenótipo OMIM: A síndrome de Treacher Collins-2 (**OMIM#613717**) é causada por mutações em heterozigose no gene *POLR1D* (**OMIM*613715**). Esta condição clínica é caracterizada por inclinação bilateral para baixo das fissuras palpebrais, colobomas das pálpebras inferiores com escassez de cílios

mediais, hipoplasia dos ossos faciais, fenda palatina, malformação das orelhas externas, atresia dos canais auditivos e perda auditiva condutiva bilateral [6].

A especificidade dos ensaios baseados em NGS para detectar grandes deleções/duplicações é baixa e um método alternativo como MLPA, Microarray ou PCR é recomendado para confirmação da varinate. No entanto, recomendamos discutir a opção de metodologia de teste alternativo com o Suporte Técnico do Laboratório antes de prosseguir com a escolha do exame de confirmação.

Com base nas evidências acima, **essa deleção contígua é classificada como uma provável 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.

Teste nos pais é fortemente recomendado e a classificação das variantes pode mudar com base na análise de segregação.

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 coleta, preparação e envio das amostras à Singular Medicina de Precisão são orientadas visando à manutenção da qualidade da amostra para realização do exame. Informamos ainda que se a coleta da amostra biológica não for realizada pela Singular Medicina de Precisão, presume-se que a amostra pertence ao paciente nomeado ou identificado no rotulado do recipiente/solicitação do teste, a

empresa não pode ser responsabilizada por troca de amostras, dados incompletos ou incorretos que possam interferir no resultado, 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. 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.

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. Dauwerse JG *et al.*, Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome. *Nat Genet.* 2011 Jan;43(1):20-2.



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