



Mapa
Genoma Brasil

Aconselhamento Genético em Medicina Genômica

Teste Genético

Livro 3



A Beneficência
Portuguesa
de São Paulo



PROADI-SUS
Programa de Apoio ao Desenvolvimento
Institucional do Sistema Único de Saúde



MINISTÉRIO DA
SAÚDE



Projeto Mapa Genoma Brasil

BP - A Beneficência Portuguesa de São Paulo

Gerente Executivo PROADI SUS:

Dante Dianezi Gambardella

Coordenadora Projeto Mapa Genoma Brasil

Mariana Beraldo da Costa Saad

Coordenador Projeto Qualificação e Treinamento

José Pereira de Souza

Assessoria Técnica

Erika Maria Monteiro Santos

Autores

Pablo De Nicola

Silvana Soares dos Santos

Equipe Qualificação e Treinamento

Cristiane da Fonseca Amancio

Fernanda Cascapera

Fernando Alves Alencar de Moura

Giovanna Tiemi Goto Forniells

Luanda Guimarães da Silva

Lucas Campacci

Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.



Su má rio



1 Teste Genético 04

Aplicação clínica do teste genético 05

2 Tipos de Teste Genético 07

Cariótipo 07

A Hibridação in situ por Fluorescência (FISH) 13

MLPA 16

Hibridização Genômica Comparativa (CGH-Array) 18

Sequenciamento do DNA 20

Sequenciamento Sanger 23

Sequenciamento de Nova Geração (NGS) 24

3 Análise de Variantes 30

Classificação de Variantes 30

Tipos de Variantes 32

Polimorfismo de nucleotídeo 33

Variante Indels 33

Variação do número de cópias 34

Descrição das variantes 34

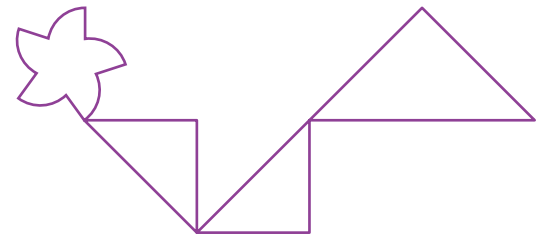
Considerações finais 36

Referências 37

Dicas

- O índice é interativo, permitindo que você seja direcionado para o tópico desejado com um clique.
- Além disso, ao clicar no logo do Mapa Genoma Brasil no topo, você retornará ao índice.





1. Teste Genético

O teste genético (TG) tem como definição clássica, feita por Holtzman & Watson em 1997, a análise do DNA, RNA, cromossomos, proteínas e certos metabólitos com a intenção de detectar condições herdáveis para finalidades clínicas de acompanhamento de indivíduos e famílias. De forma mais específica, essa análise visa identificar, quais são as alterações na sequência do DNA ou na estrutura cromossômica. Além disso, é possível realizar a análise de RNA como resultado da expressão gênica ou por meio de análise bioquímica para medir a produção específica de proteínas (American Medical Association, 2019).

Na prática clínica podemos destacar, portanto que a utilização do TG permite diagnosticar doenças de recém-nascidos, crianças ou adultos, prever riscos para condições específicas ou obter informações que podem ser usadas para personalizar tratamentos. (Burke 2002). Além disso, também pode ser usado para determinar filiação biológica de uma criança por meio de teste de paternidade de DNA, ser usado para prever amplamente a ascendência de um indivíduo e também na prática forense.

Na atualidade o recurso do TG está cada vez mais frequente dado o grande desenvolvimento de pesquisas de relação fenótipo genótipo, mais conhecida

como GWAS (genome-wide association studies) (Korf et al., 2019), e também pelo custo estar mais acessível (Freitas & Pinto, 2021). Não somente indivíduos acometidos por patologias buscam por resposta com o uso do teste genético, mas também indivíduos saudáveis que buscam como realizar atitudes preventivas personalizadas a partir do conhecimento de suas informações moleculares.

É uma nova era tanto para os usuários de serviços de saúde quanto para os profissionais de saúde. O grande número de informações que podem ser obtidas a partir do teste genético abre espaços para novas discussões desde os aspectos preventivos, tratamentos e também de justificativas por fenótipos tão frequentes em algumas famílias.

Todas essas informações precisam ser discutidas em um contexto educativo e seguro antes da realização do teste para que não ocorra desconfortos e conflitos de informação no momento em que o resultado do teste seja revelado. Por isso, o teste genético deve ser realizado em um contexto de aconselhamento genético, do qual a etapa é denominada aconselhamento genético pré-teste (McPherson, 2006).

Antes da indicação do teste genético alguns fatores são avaliados como a motivação dos indivíduos que estão em busca por informações e se as informações moleculares trarão benefícios. Esses fatores são todos realizados ao longo do aconselhamento genético com a avaliação clínica e da história familiar, como já discutimos anteriormente no Livro 2.

A seguir vamos discutir quais as

principais aplicações e quais os tipos de teste genético mais utilizados no cenário clínico bem como ressaltar alguns pontos importantes que devem ser elaborados entre profissionais, usuários do serviço de saúde e seus familiares antes da realização do TG.

Aplicação clínica do teste genético

São diversas as formas das quais o teste genético pode ser aplicado na prática clínica, beneficiando indivíduos que possam estar em risco aumentado para alguma condição genética específica (Metcalf, 2018). O conhecimento molecular adicionado das informações clínicas e da história familiar podem nortear além de condutas terapêuticas, mas estratégias de prevenção e diminuição de risco.

A seguir, vamos expor algumas das formas das quais o teste genético pode ser aplicado, a cada uma delas a classificação se dá de acordo com o seu propósito (Iowa Institute of Human Genetics):

- a.** Teste genético clínico: são realizados para ter o perfil genético do indivíduo como informação adicional sem uma finalidade terapêutica ou diagnóstica específica;
- b.** Teste genético diagnóstico: realizado para encontrar a causa de uma doença ou sintomas que já estão presentes no indivíduo.

- c.** Teste genético pré sintomático (preditivo): antes do indivíduo expressar algum sintoma, para descobrir se há um risco para o desenvolvimento de certo tipo de doença ou se há alguma variante que poderá ser passada para descendentes futuros os colocando em risco também.
- d.** Teste genético de detecção do portador: é um teste genético que identifica mutações em genes relacionados a doenças recessivas. Se os dois membros do casal forem testados, o resultado poderá fornecer informações sobre o risco de ter um filho com uma condição genética recessiva.
- e.** Teste genético pré-natal: é um teste durante a gravidez para ver se o bebê terá uma doença.
- f.** Teste genético do recém-nascido: um teste realizado um a dois dias após o nascimento do bebê para ver se o bebê tem certas doenças
- g.** Teste genético farmacogenômico: para descobrir o melhor remédio e dose para o indivíduo com base em suas variantes de DNA.

A genética molecular e o seu vasto avanço para auxiliar a prática clínica resultaram em um grande aumento no número de

distúrbios e de tratamentos para os quais os testes genéticos estão disponíveis (McPherson, 2006). É importante ressaltar, no entanto, que mesmo com tantos avanços no mundo das metodologias moleculares, o TG sozinho não garante uma medicina personalizada de qualidade (Metcalf, 2018). Toda a história pessoal e familiar junto com as informações moleculares torna todo o quadro mais completo e relevante para indivíduos e seus familiares, fazendo da medicina de precisão uma abordagem além dos genes e sim de tudo o que envolve o corpo físico e o meio onde vive. O relacionamento com o paciente é muito importante para explicar os motivos do teste, os resultados do teste, o plano de tratamento e as implicações para outros membros da família. O padrão de atendimento hoje para pacientes com doenças genéticas requer colaboração entre os prestadores de cuidados primários, especialistas de outros níveis de atenção e laboratórios (McPherson, 2006; Amendola et al, 2021).

Nesse contexto, o teste genético é solicitado após uma anamnese e construção do heredograma de forma mais completa possível, e com a avaliação de risco junto com o propósito bem definido da obtenção de informações moleculares e suas implicações. Além disso, o profissional de saúde também precisa compreender quais as melhores técnicas para acessar as informações genéticas (Amendola et al, 2021).

A seguir, vamos discutir os tipos de teste genético e quais as informações moleculares que eles trazem em benefício do paciente e seus familiares.

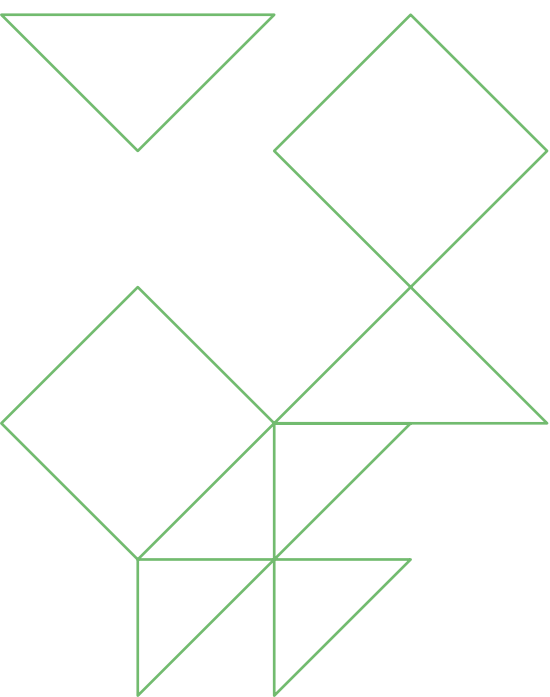
2. Tipos de teste genético

Cariótipo

O cariótipo é a constituição cromossômica de um indivíduo que pode ser verificada quando os 46 cromossomos estão organizados em pares de acordo com o tamanho, forma e padrão de bandas. Pelo exame do cariótipo é possível identificar alterações do número de cromossomos e também alterações que envolvam a sua estrutura (Steven & Martha, 2013); (Lawce & Brown, 2017).

Esse exame é mais utilizado, portanto, para a detecção de alterações cromossômicas, sendo indicado quando há um quadro clínico sugestivo de uma cromossomopatia como:

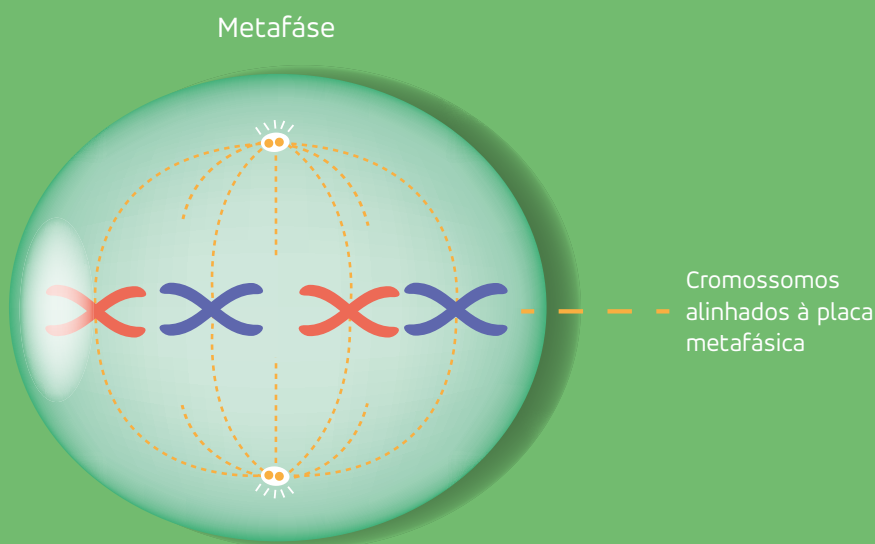
1. Restrição de crescimento intrauterino e pós natal;
2. Características fenotípicas de síndromes cromossômicas;
3. Casal com histórico de aborto precoce de repetição ou de infertilidade;
4. Casos de natimorto ou morte neonatal;
5. Genitália atípica;
6. Diagnóstico pré-natal em casos de idade materna avançada;
7. Avaliação de tumores;
8. Esclarecimento de resultados não muito bem definidos por outras técnicas de análise cromossômica (Steven & Martha, 2013).



Mas como se realiza o cariótipo?

Para que seja possível realizar a análise cromossômica com melhor identificação, é importante que os cromossomos estejam bem compactados, por isso as células analisadas estão na fase de metáfase do ciclo celular.

Vamos recordar?



A metáfase é uma das fases da mitose da qual os cromossomos migram para a região equatorial da célula com seu maior nível de compactação. Cada cromossomo possui duas cromátides irmãs que se prendem aos microtúbulo por meio de uma região denominada cinetócoro.

O alinhamento correto dos cromossomos e das cromátides irmãs é extremamente necessário para a correta distribuição do material genético para as células filhas. Este plano equatorial é chamado de placa metafásica e esta é a origem do nome desta fase do ciclo celular.

O método mais utilizado para realizar o cariótipo é através da cultura de linfócitos do sangue periférico, mas pode ser feito com outras células e tecidos como fibroblastos da pele e células da medula óssea; em materiais como células fetais do líquido amniótico ou do sangue do cordão umbilical; ou, ainda, de diferentes tecidos de material de aborto ou de células tumorais (Rooney, 2011).

As etapas para a realização do exame estão descritas na figura 1 (Yunis & Sanchez, 1973).

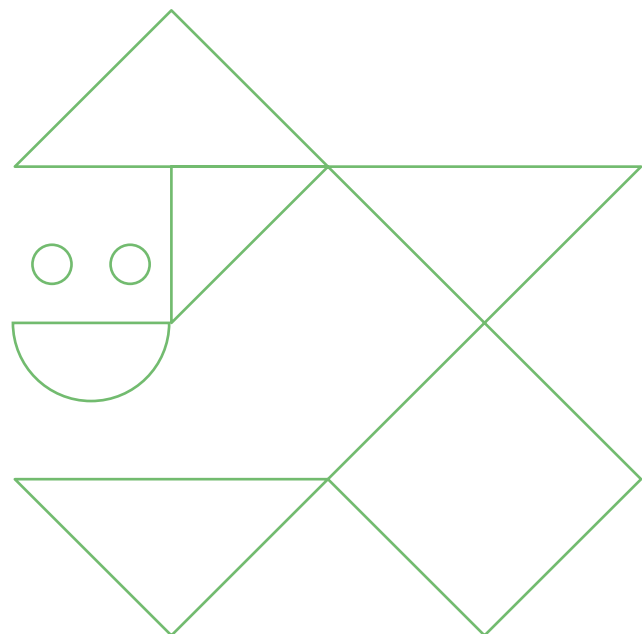


Figura 1. Etapas para realização do cariótipo em banda G para diferenciar cromossomos do mesmo tamanho e com a mesma posição do centrômero, de acordo com o nível de condensação do DNA.

A análise do cariótipo é realizada em microscópio podendo ter auxílio de softwares para a organização dos cromossomos e documentação dos mesmos. Com o cariótipo podemos identificar as alterações cromossômicas tanto numéricas quanto estruturais.

As alterações numéricas são referentes ao número de cromossomos podendo estas estarem em excesso ou em falta. Já com relação às questões estruturais, podemos identificar a quebra, como deleções e também as translocações.

Esses conceitos foram abordados no Livro 2 e podem ser consultados.

O registro de um cariótipo é dado primeiro pelo número total de cromossomos, seguido por vírgula e pela especificação dos cromossomos sexuais. Assim, os cariótipos femininos e masculinos normais são descritos respectivamente como 46,XX e 46,XY.

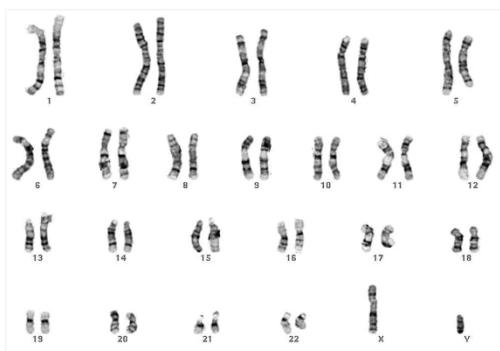
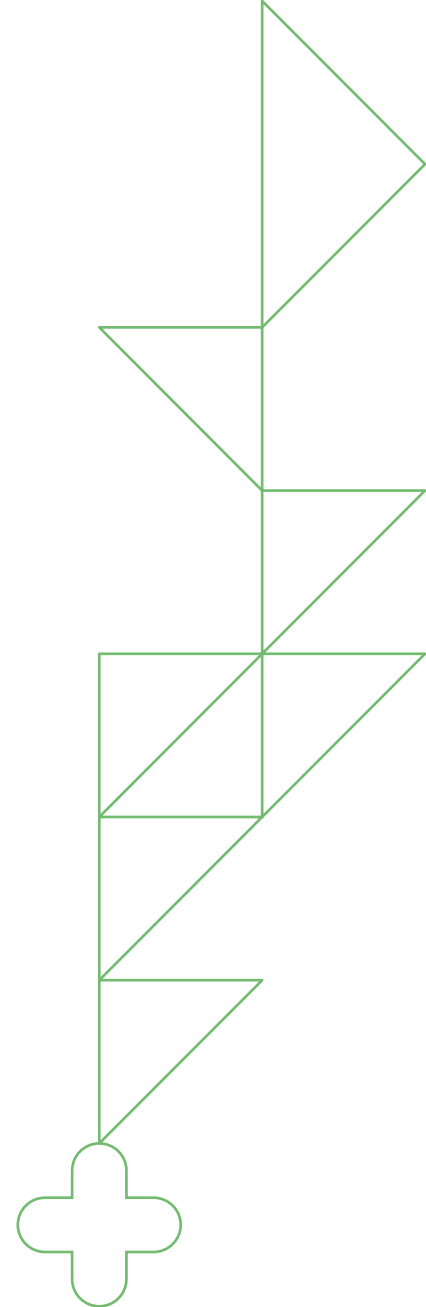


Figura 2A. Cariótipo normal masculino: 46,XY



Figura 2B. Cariótipo normal feminino: 46,XX

Os pares de cromossomos são organizados no cariótipo de acordo com o tamanho, forma e padrão de bandas. O Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana (ISCN, 2016), possui como norma que os cromossomos sejam divididos em regiões, bandas e sub-bandas, de forma a ser possível o registro das alterações em sua estrutura. As bandas são numeradas a partir do centrômero em direção às extremidades dos braços cromossômicos.

Nas alterações cromossômicas numéricas, os cromossomos extras são descritos após o sinal de "+", e em falta são descritos após o sinal de "-". Então um resultado de cariótipo descrevendo 47,XY,+21, relata a trissomia do cromossomo 21 (há um cromossomo 21 a mais), em um indivíduo do sexo masculino (figura 3A). Quando há trissomia dos cromossomos sexuais, como por exemplo na Síndrome de Klinefelter, o cariótipo é descrito 47,XXY (Figura 3B).

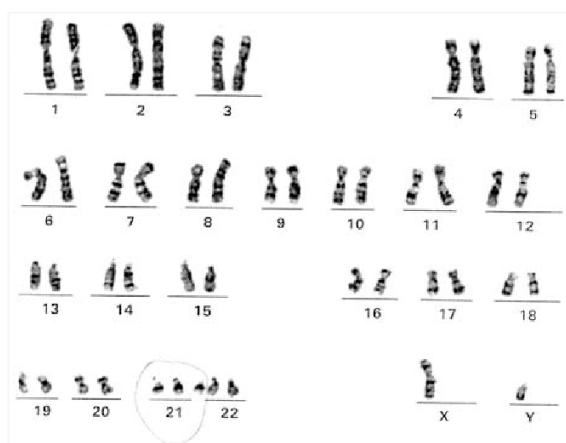


Figura 3A. Cariótipo com resultado de Trissomia do cromossomo 21 em um indivíduo do sexo masculino: 47,XY,+21

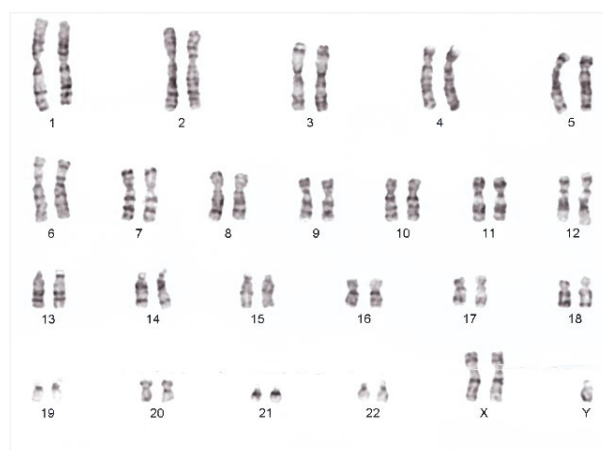
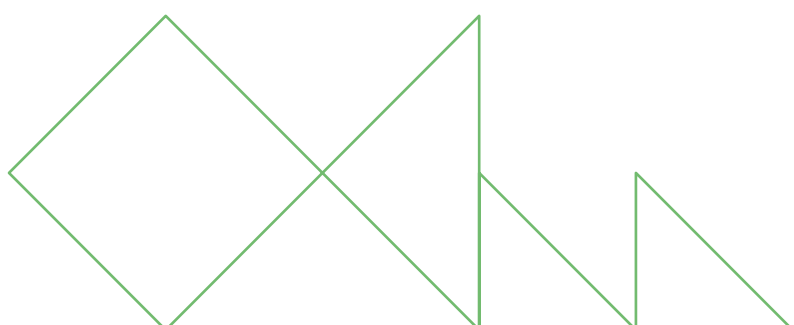


Figura 3B. Cariótipo com resultado de Síndrome de Klinefelter: 47,XXY



No livro 2 vimos o conceito de mosaicismismo do qual também é possível identificar no cariótipo. Quando há a presença de mosaicismismo cromossômico, ou seja, há duas ou mais linhagens celulares com cariótipos distintos, a representação é feita com sendo cada linhagem separada por uma barra na diagonal e com o número de células analisadas de cada linhagem entre colchetes. Portanto, um cariótipo com a descrição 47,XY,+21[24]/46,XY[16] indica uma trissomia do cromossomo 21 em mosaico, a partir de 40 células, sendo 16 delas com cariótipo normal.

Alterações cromossômicas estruturais também possuem suas especificações padronizadas, devendo conter o total de números de cromossomos, os cromossomos sexuais, a abreviatura entre parênteses do tipo de alteração estrutural, número do(s) cromossomo(s) envolvido(s) na alteração (ou a letra para X e Y), e abanda em que ocorreu a quebra.

A seguir temos uma tabela com a abreviatura dos principais tipos de alterações estruturais com exemplos de resultados de cariótipos.

Tipo de alteração cromossômica estrutural	Abreviatura	Exemplo de descrição no cariótipo	Leitura
Deleção (Quando há uma perda de material cromossômico)	del	46,XY,del(5)(p13)	Indivíduo do sexo masculino, com uma deleção no braço curto do cromossomo 5, com ponto de quebra na banda 5p13, resultando na monossomia parcial da região terminal do braço curto do cromossomo 5 até a banda 5p13.
Duplicação (Presença de um segmento extra no cromossomo)	dup	46,XXdup(1)(q22q25)	Indivíduo do sexo feminino com uma duplicação no braço longo do cromossomo 1 entre as bandas 1q22 e 1q25.
Inversão (Quando uma parte do cromossomo se fragmenta e, depois, se liga ao mesmo cromossomo, porém de forma invertida)	inv	46,XX,inv(9)(p12q13)	Indivíduo do sexo feminino com uma inversão no cromossomo 9 com ponto de quebra entre as bandas 9p12 e 9q13.
Translocação (Troca de partes entre os cromossomos)	t	46,XY,t(6;14)(p21;q32)	Translocação entre os cromossomos 6 e 14 com pontos de quebra nas bandas 6p21 e 14q32.

Tabela 1. Abreviatura dos principais tipos de alterações estruturais com exemplos de resultados de cariótipos.

A Hibridação in situ por Fluorescência (FISH)

A técnica FISH foi desenvolvida em 1980 para detecção de microdeleções, microduplicações e rearranjos complexos. No início, essa técnica começou a ser utilizada no diagnóstico de síndromes genéticas e diagnóstico pré-natal, e hoje já é utilizada também para diagnóstico e prognóstico de neoplasias por exemplo (Ratan el al, 2017).

Mas como se faz a técnica FISH?

Essa técnica molecular é baseada na detecção de pequenos seguimentos de DNA ou RNA a partir do uso de sondas específicas marcadas com fluorescência que pareará com as bases complementares de uma sequência alvo de DNA correspondente de um cromossomo específico (Ratan el al, 2017).

É por isso que se dá o nome de hibridização por fluorescência pelo o fato do pareamento ocorrer com a presença de um marcador fluorescente.

Sondas: são sequencias de nucleotídeos complementares desenvolvidos a partir de seguimentos conhecidos de DNA ou RNA que se deseja identificar.



A figura 4 mostra o processo de toda a técnica FISH. É importante ressaltar que para empregar essa técnica é necessário ter a suspeita da região de interesse em investigação previamente.

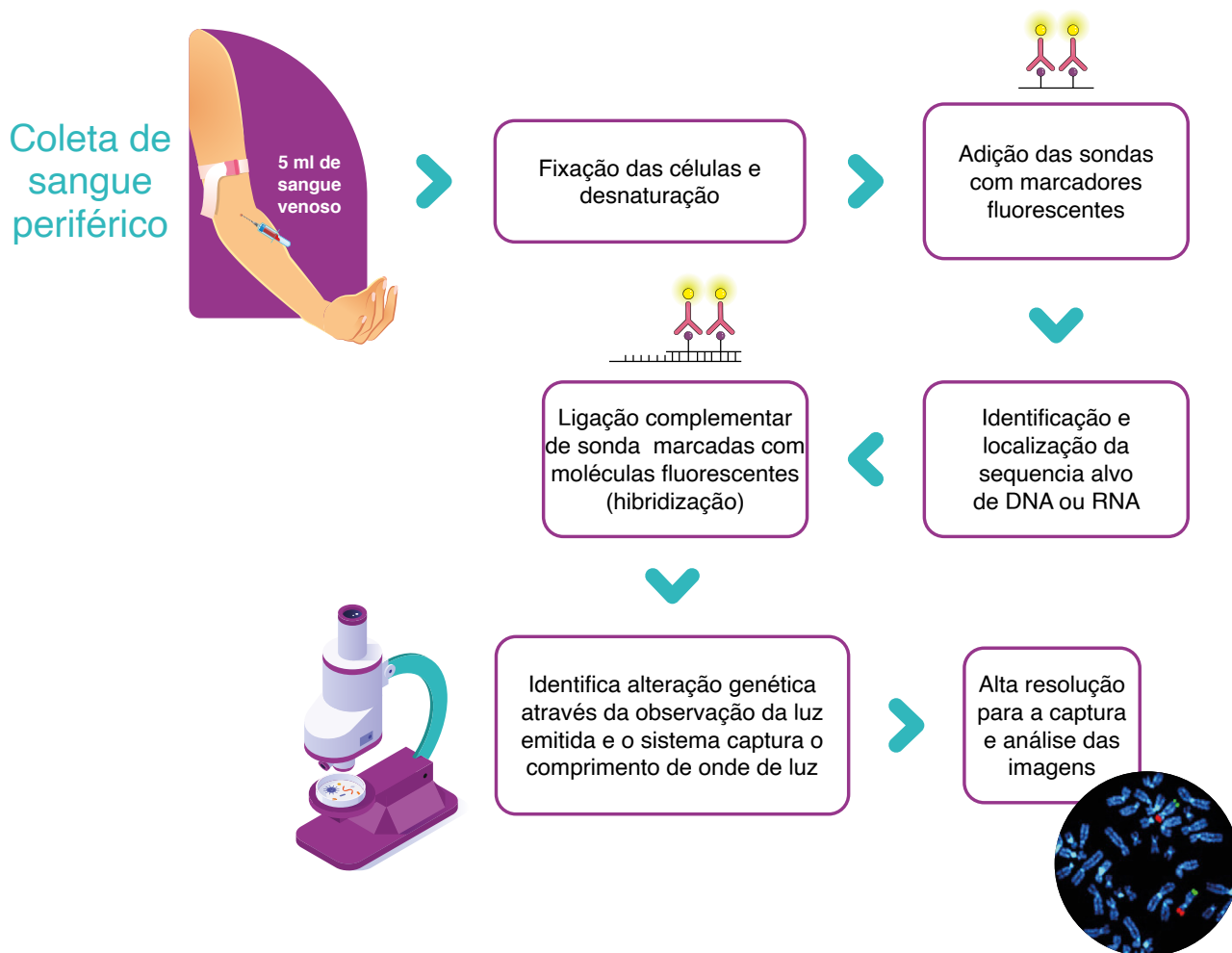


Figura 4. Processo da realização da Hibridização in situ por Fluorescência (FISH).

Para auxiliar a visualização de um resultado, a figura 5 mostra a diferença de um resultado do exame FISH normal e um outro com uma possível deleção no braço longo do cromossomo 22 o que configura o diagnóstico de Síndrome DiGeorge.

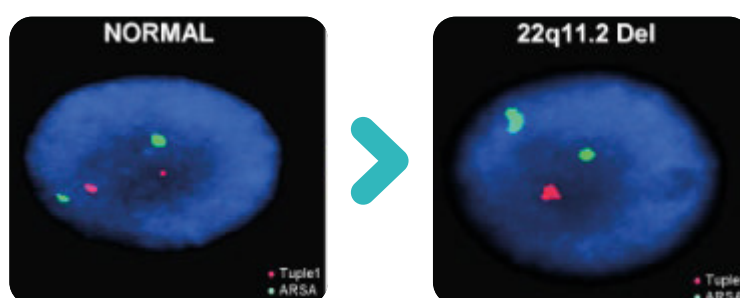


Figura 5. Análise pelo método FISH - Na imagem à esquerda há 2 pares de marcadores e na direita apenas 1 par completo e um sozinho; indicando uma possível deleção.
Fonte: Adaptado de Blog Genomika.

Você sabia?

Síndrome de DiGeorge:

Imunodeficiência que provoca alterações na imunidade celular e má formações faciais e cardíacas; a causa desta síndrome é uma deleção de um gene ou de um grupo de genes localizados na região 22q1. identificar.



MLPA

O MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification ou Amplificação Multiplex de Sonda Dependente de Ligação) é uma técnica relativamente recente, descrita em 2002 desenvolvida com a capacidade de evidenciar a falta ou excesso de material genômico (Stuppia et al. 2012). De forma mais específica são as alterações conhecidas como grandes deleções, amplificações ou inserções no gene com mais de 1.000 pares de base (Stuppia et al. 2012). Quando realizamos a técnica do MLPA, podemos analisar regiões específicas sendo éxons de um único gene ou éxons de alguns genes associados a uma síndrome. Nesse sentido, é uma técnica que é solicitada na prática clínica para pacientes com suspeita de alguma doença já conhecida.

As etapas do MLPA para que possamos chegar em um resultado, são divididas em seis principais partes conhecidas como:

1. Desnaturação do DNA da amostra;
2. Hibridização;
3. Ligação;
4. Amplificação por PCR;
5. Separação de Fragmentos;
6. Análise.

A figura 6 exemplifica todo o processo da técnica.

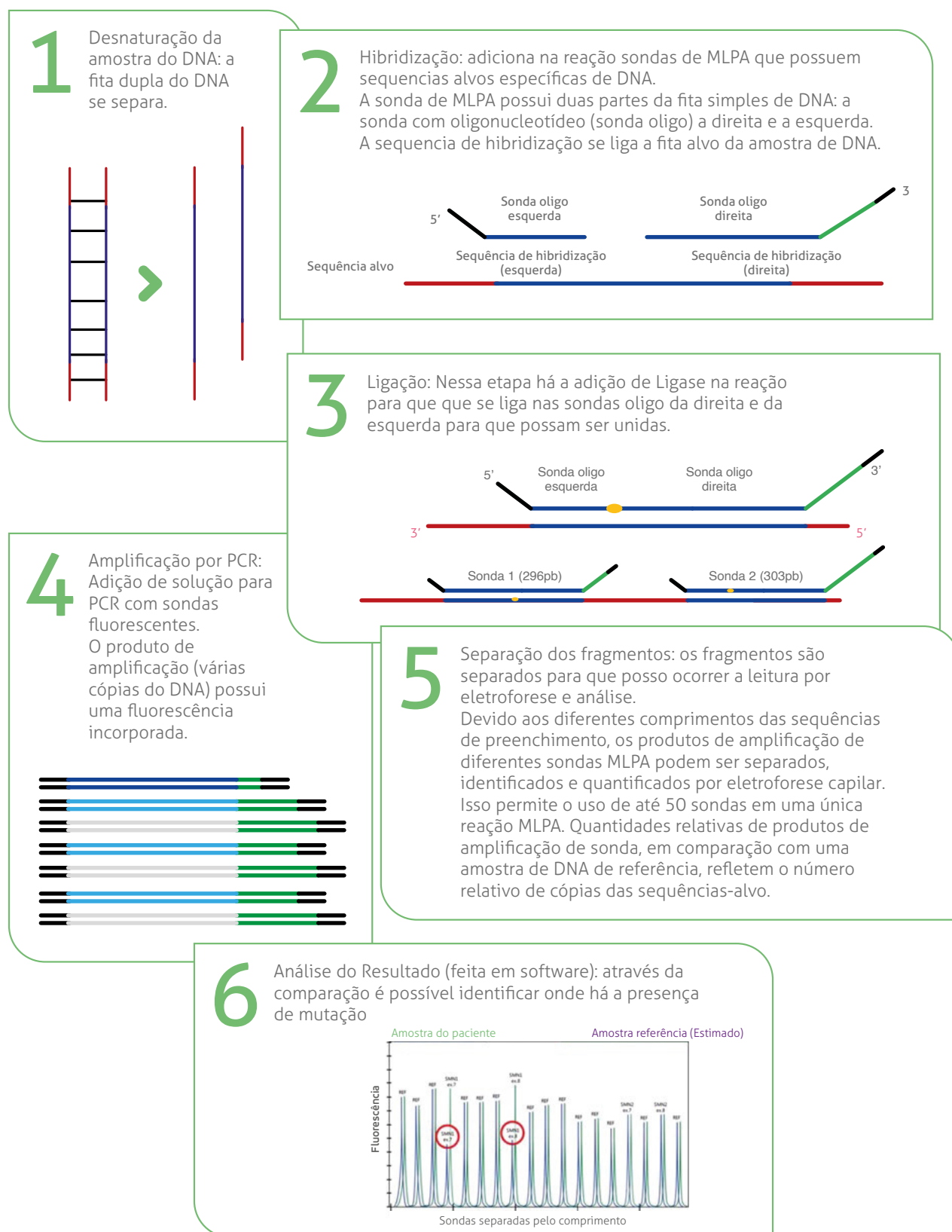


Figura 6. Processo de realização da técnica Amplificação Multiplex de Sonda Dependente de Ligação (MLPA)

Hibridização Genômica Comparativa (CGH-Array)

Array é uma técnica que permite investigar simultaneamente milhares de sequências genômicas para a detecção de ganhos (duplicações) e/ou perdas (deleções) de segmentos cromossômicos (maiores que 100kb) que não são visualizados no exame de cariótipo (Costa et al, 2020).

De forma resumida, o experimento consiste na hibridização do material do paciente nos chips de array, e por intensidade do sinal fluorescente, é capaz de determinar as alterações de forma quantitativa. Existem diversas plataformas de array disponíveis, a plataforma CGH array será a que vamos discutir a seguir, pois é uma das mais utilizadas para investigação cromossômica de alta resolução (Shinawi & Cheung, 2008).

O CGH array é uma técnica que como todas as outras possui etapas específicas para que o resultado seja obtido da melhor forma. O exame começa quando após a coleta do material biológico do paciente (amostra de sangue, saliva, vilosidades coriônicas, líquido amniótico ou outras células ou tecidos) a realização da extração do DNA do mesmo é realizada.

Método de extração do DNA de uma amostra

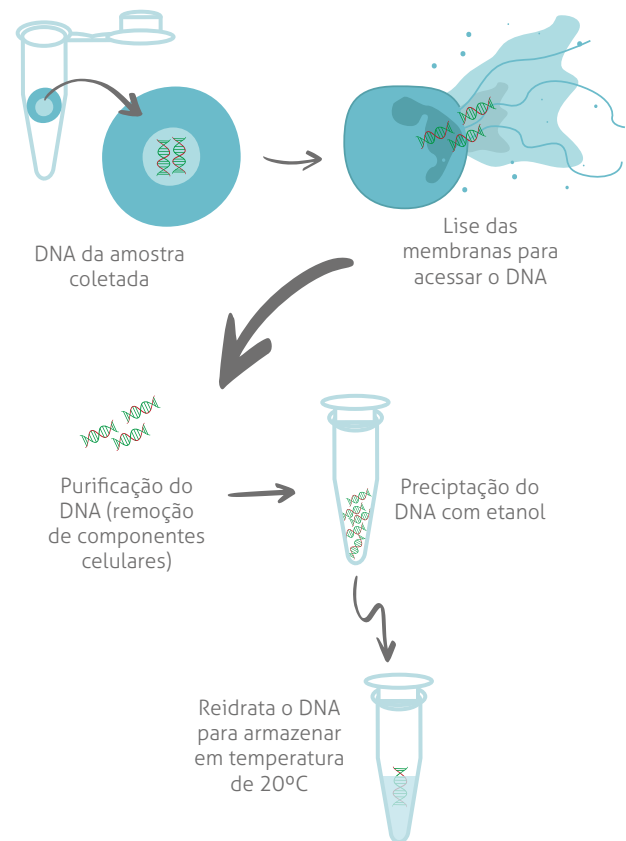
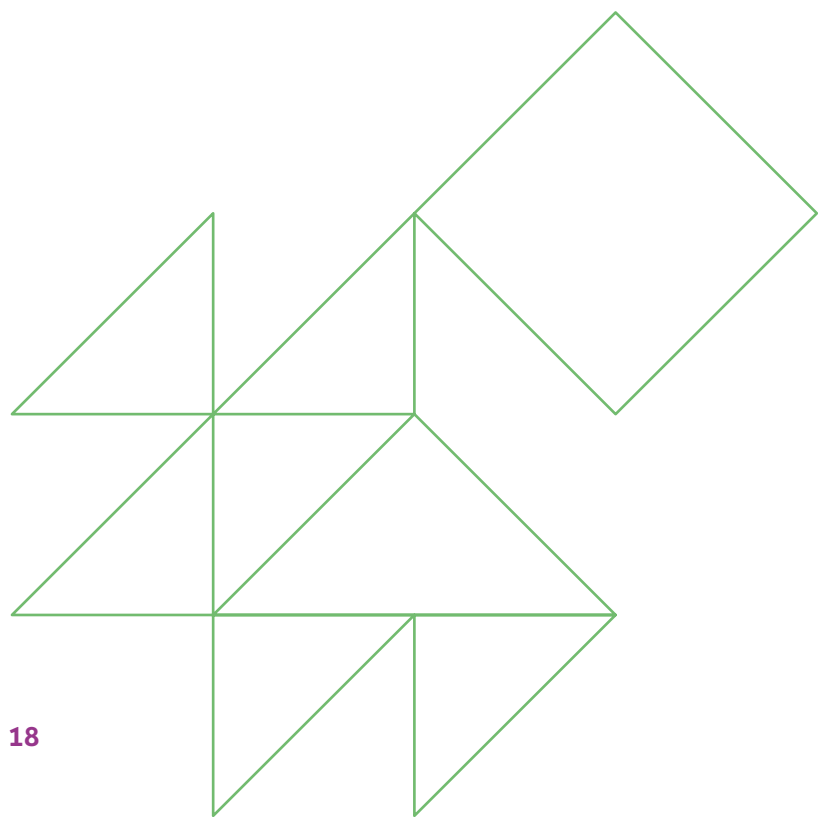


Figura - BioRender.



A mesma quantidade de DNA do paciente e um DNA de referência (controle) são então marcados com diferentes fluoróforos. Eles são então misturados e desnaturados de fita dupla para fita simples. Na próxima etapa, eles são hibridizados em um chip com fragmentos de DNA imobilizados (sondas). Essas sondas cobrem o genoma humano da maneira mais uniforme possível e podem ser personalizadas de acordo com as necessidades da análise.

Os fragmentos de DNA do paciente e do controle competem pela hibridização com as sequências complementares nas sondas de matriz. Um scanner a laser de alta resolução é então usado para

capturar e quantificar a intensidade do sinal fluorescente de cada cor que hibridizou para cada sonda. Finalmente, a relação entre a intensidade do sinal fluorescente no DNA do paciente e o DNA de referência é calculado para cada sonda do array, obtendo informações sobre o número relativo de cópias de sequências no genoma do paciente em comparação com o genoma de referência.

Toda a informação obtida é interpretada por um software de análise que permite atribuir os dados à respectiva região cromossômica e representá-los (Figura 7).

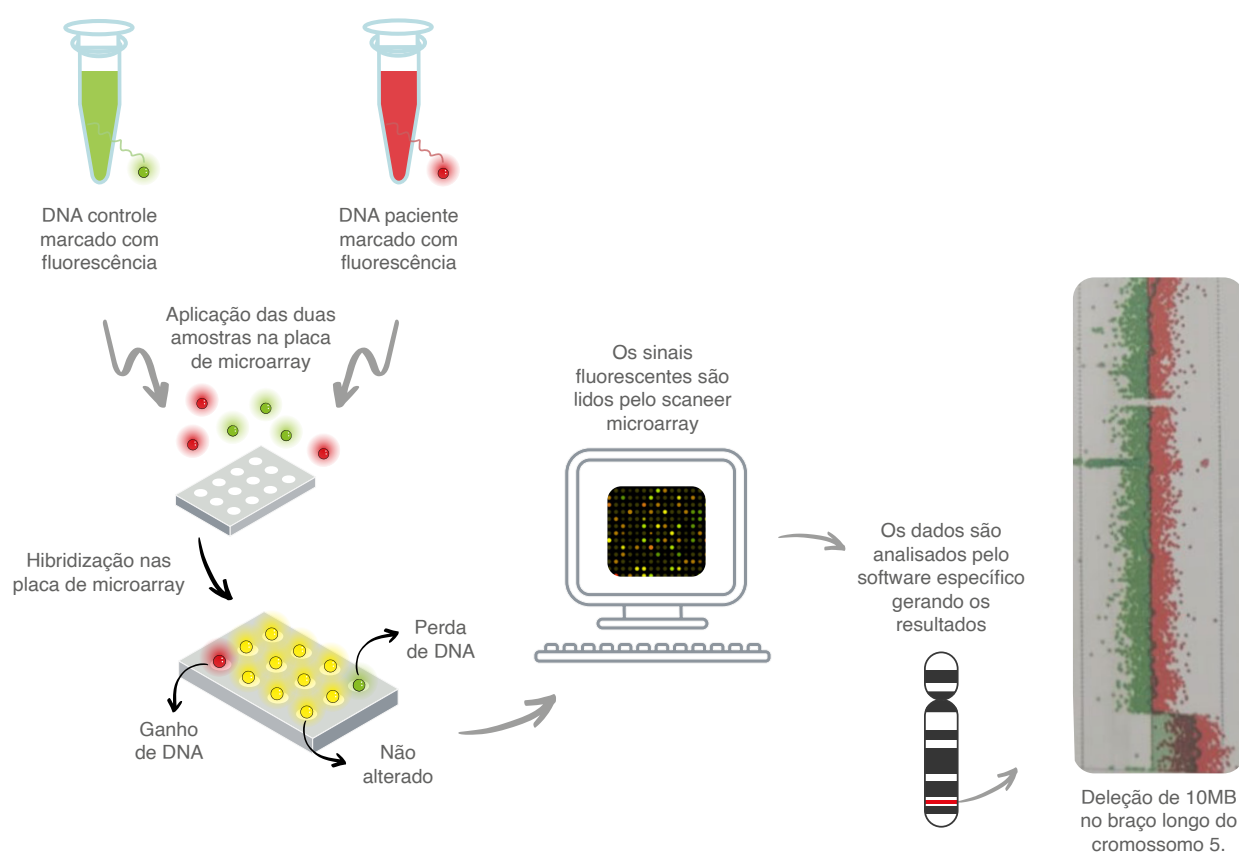


Figura 7. Etapas do CGH array. (Adaptado de learn.biorender.com)

Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA é um processo que determina a sequência de nucleotídeos do DNA. Mas antes de aprendermos as técnicas de sequenciamento, é muito importante começarmos a compreender uma técnica básica da biologia molecular que é utilizada no processo de sequenciamento. Essa técnica é conhecida como PCR.

O que é a PCR?

A PCR (reação em cadeia da polimerase) é uma técnica da biologia molecular da qual é utilizada para amplificar (formar várias cópias) pequenas regiões do DNA (van Pelt-Verkuil et al, 2008). Essas regiões devem ser conhecidas, uma vez que é necessário um par de primer para sua amplificação.

PRIMERS: são sequências únicas de nucleotídeos capazes de se anelar às suas sequências alvo de DNA durante a PCR.

Os primers são desenhados baseando-se no código genético (DNA molde) da espécie que se deseja estudar.

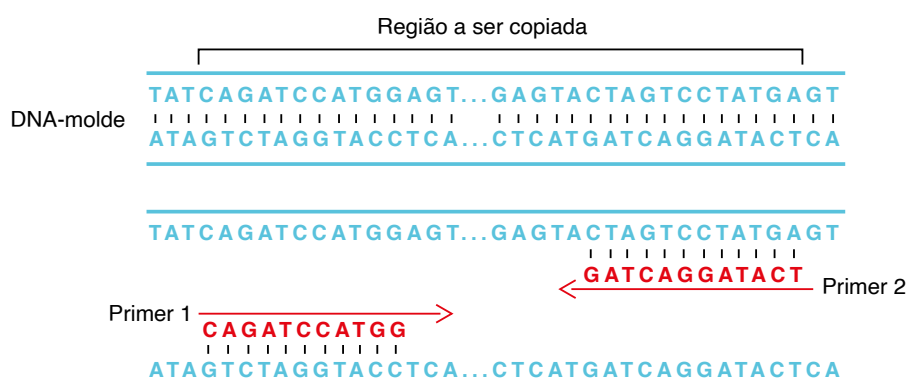


Figura - BioRender.

Com a PCR, é possível, portanto, que uma sequência de DNA seja amplificada muitas vezes, produzindo número de cópias suficientes de DNA para serem analisadas em outras técnicas e também para testes diagnósticos.

É importante destacar que existem

componentes importante que devem ser adicionados na reação para que tudo ocorra de forma adequada.

Os componentes dessa reação estão descritos na tabela 2.

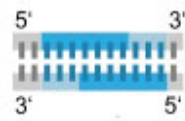
Componentes	Função	Ilustração esquemática
DNA molde	Contém a sequência a ser amplificada.	
Primers	Sequências específicas para anelar na sequência do DNA molde.	
dNTPs	Bases (A, T, C, G) para complementar a sequência da fita de DNA.	
Taq polimerase	Enzima para realizar o processo de adicionar as bases nitrogenadas.	
Buffer (tampão)	Solução com a capacidade de atenuar a variação dos valores de potencial hidrogeniônico (pH).	
Tubo de PCR	Armazena todo o mix da reação	
Termociclador	Equipamento que automatiza o processo de amplificação de uma sequência específica de DNA a partir de uma pequena amostra.	

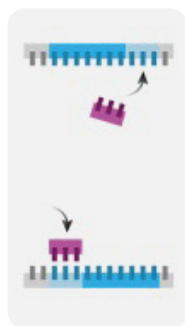
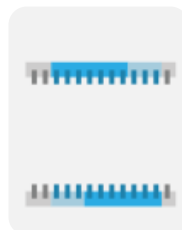
Tabela 2. Componentes necessários para a realização da PCR. (Adaptado de learn.biorender.com)

Todo o processo possui três principais etapas denominadas de desnaturação, anelamento e extensão.

A seguir, na figura 8, será possível evidenciar todos os passos dessa técnica com as respectivas explicações.

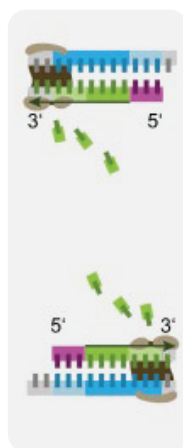
1

Desnaturação: o processo através do qual a dupla fita de DNA se desenrola e separa-se em duas cadeias simples. Geralmente acontece em temperaturas próxima a 95°C.



2

Anelamento: a reação diminui a sua temperatura e os primers conseguem se ligar às suas sequências complementares no DNA molde de fita simples.



3

Extensão: a temperatura da reação volta a se elevar para que a *Taq* polimerase estenda os primers, adicionando as bases nitrogenadas, sintetizando novas fitas de DNA.

Figura 8. Etapas da PCR. (Adaptado de learn.biorender.com)

A finalização dessas três etapas pela primeira vez é chamada de primeiro ciclo. Vários ciclos são realizados para que o processo se repita, assim será possível a obtenção de muitas cópias do DNA. Podemos ver esse processo na figura 9.

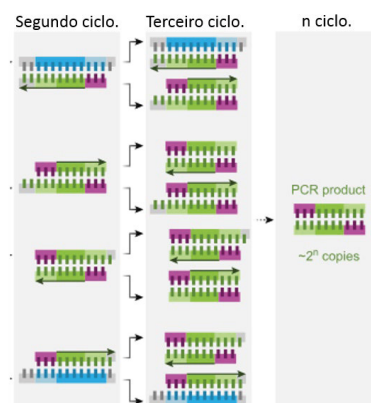


Figura 9. Esquema de repetição dos ciclos da PCR para a amplificação do DNA. (Adaptado de learn.biorender.com)

Sequenciamento Sanger

O primeiro sequenciamento de um genoma completo foi publicado em 1977 pelo duplo ganhador do Prêmio Nobel de Química Frederick Sanger (Sanger et al, 1977). Isso correspondia ao genoma de tamanho pequeno de um bacteriófago. Desde então, tem havido muitos organismos complexos cujo DNA foi sequenciado.

Isso foi possível graças aos avanços contínuos nas áreas de bioquímica e genética molecular, mas também em outras áreas, como nanotecnologia e computação (Garrido-Cardenas, J., et al, 2017).

Embora esse método fosse revolucionário para a época, contudo era muito lento e caro. Essa técnica tem como objetivo determinar a sequência de nucleotídeos (Adenina, Guanina, Citosina e Timina) de regiões específicas já conhecidas (Santos, et al. 2013).

Nesse procedimento, tudo se inicia com a realização de uma PCR para que a amostra

seja amplificada. De forma sintetizada o Sequenciamento de Sanger, portanto inicia após termos os fragmentos de diversos tamanhos diferentes do DNA que se deseja sequenciar, que foram advindos da PCR. Ao final de cada fragmento é adicionada uma marcação fluorescente com coloração específica de cada base nitrogenada. Os nucleotídeos vão sendo inseridos, até que, em determinado momento, cada base nitrogenada irá possuir uma fluorescência diferente, para que sejam distinguidas na leitura do resultado (Muzzey, et al 2015).

Após essa etapa o material passa para o sequenciador para que os fragmentos sejam separados por capilaridade em eletroforese, sendo que, os menores conseguem passar pela eletroforese mais facilmente e vão montando a sequência, até chegar nos fragmentos maiores. Dessa forma, cada fragmento é excitado com um laser e há a detecção dos fragmentos através da leitura de cores da fluorescência emitida. A figura 10 mostra um esquema de todo o processo de Sequenciamento Sanger.

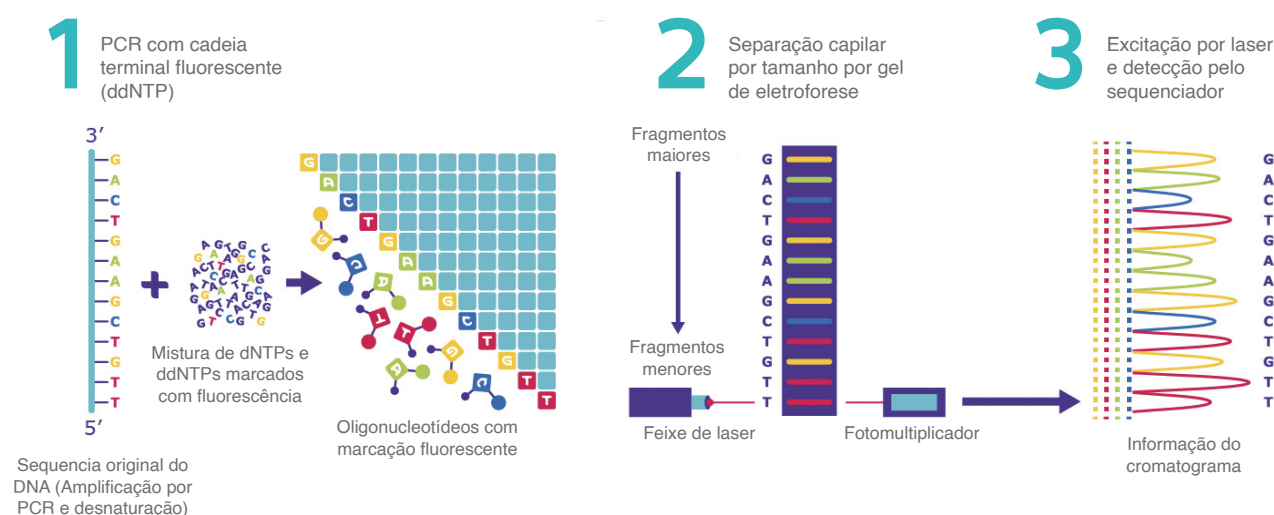


Figura 10. Técnica por sequenciamento sanger. (Adaptado de learn.biorender.com)

Como podemos evidenciar na figura 10, o resultado final é o sequenciamento de cada base formando um pico com sua respectiva cor formando a sequência do material genético.

A partir dessa sequência é possível identificar presença de variantes, pequenas inserções ou deleções pontuais.

Na figura 11B temos um exemplo de um eletroferograma evidenciando uma variante, uma vez que quando comparado ao normal Figura 11A podemos identificar uma troca de ao invés de ser a base nitrogenada Adenina, temos a base Guanina.

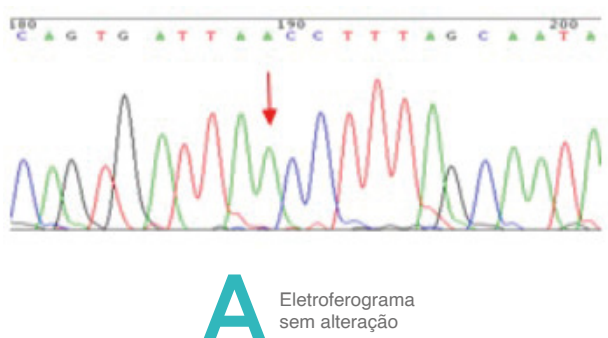
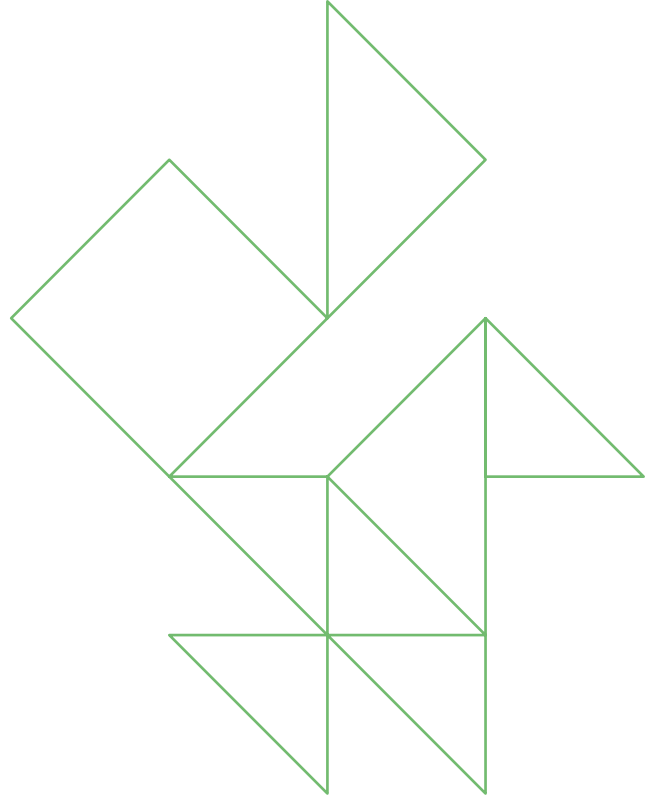


Figura 11. Eletroferograma resultante do sequenciamento sanger.

Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Com a publicação da primeira versão do genoma humano (Venter et al., 2001), observou-se um avanço nas tecnologias de sequenciamento. No ano de 2010 houve um grande aumento de publicações sobre o uso de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para investigar doenças mendelianas.

Mas o que é o NGS? O NGS é uma técnica que permite sequenciar em um único experimento milhões de pares de base simultaneamente (Facio et al, 2014). Ele favorece a realização de sequenciamento na prática clínica e analisa ao mesmo tempo centenas de genes ou mesmo um genoma completo (Muzzey, et al 2015).

Existem diferentes protocolos para a realização do NGS como o Polony (Shendure et al., 2005) utilizado no sequenciador da marca SOLiD® (Applied

Biosystems) e o método de amplificação em ponte, que utilizado pelo sequenciador Genome Analyser®, da Illumina.

De forma geral, para entendermos como é possível sequenciar muitos pares de base de forma simultânea, vamos explicar as etapas para comparar a diferença do NGS para o sequenciamento sanger.

Assim como no sequenciamento sanger, o primeiro momento se inicia coletando a amostra da qual há o interesse de ser sequenciada realizando a extração do DNA. Dependendo de cada empresa há a necessidade de uma quantidade de DNA extraído, não podendo ter nem a menos

e nem a mais para que o procedimento aconteça de forma adequada.

Como quantificar o DNA? A quantificação é a concentração de DNA extraído de uma amostra, e isso pode ser realizado através de alguns métodos como eletroforese em gel de agarose (figura 12) e por espectrofotometria que é a medição da quantidade de luz absorvida pelo DNA.

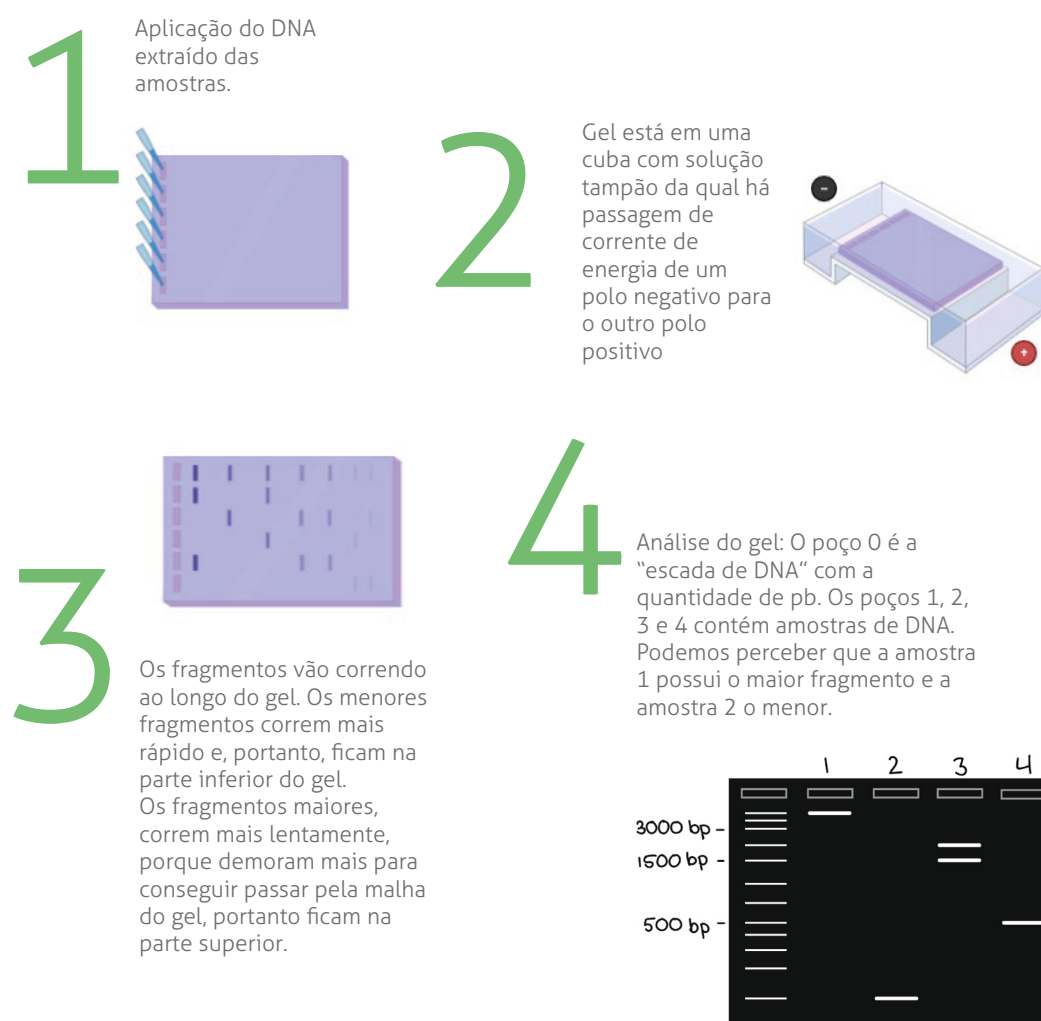


Figura 12. Processo de quantificação de DNA por gel de agarose. (Adaptado de learn.biorender.com)

Como falamos anteriormente, também podemos quantificar o DNA através da espectrofotometria. Esse processo é a medição da quantidade de luz absorvida pelo DNA em solução. Quanto maior for a absorção da luz, maior a concentração do DNA na solução analisada. Isso é medido através do equipamento como espectrofotômetro que calcula o valor de DNA contido naquela amostra.

Outra etapa importante é a preparação da biblioteca, que é, de fato, a preparação da amostra para que seja sequenciada com todos os adaptadores necessários. O sequenciamento, que será a leitura

do material genético, é realizado pelo sequenciador, e com isso a análise dos dados gerados, pode ser realizada.

O preparo da biblioteca e a técnica de sequenciamento NGS depende de protocolos diferentes existentes no mercado.

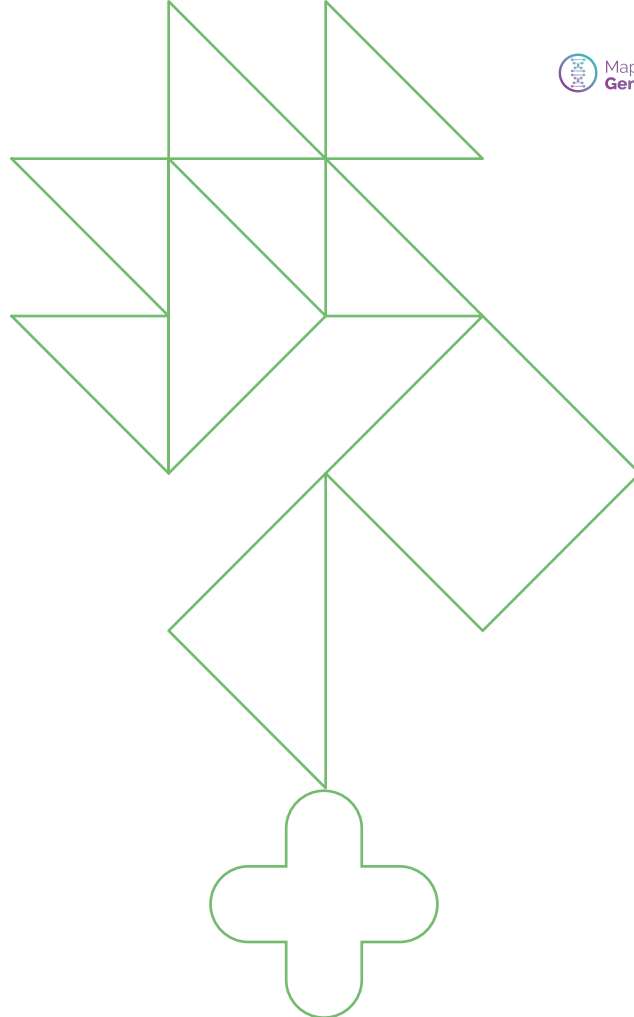
Devido a quantidade de dados gerados, toda a análise dos resultados deve ser feita por profissionais de conhecimento amplo de bioinformática.

A análise desse tipo específico de dados deve ser feita para que todos os artefatos possam ser eliminados e não confundidos com mutações.



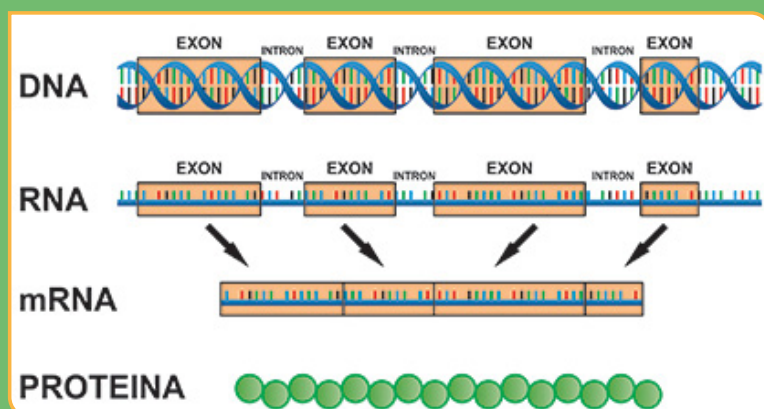
Figura 13. Processo de realização do NGS. (Adaptado de learn.biorender.com)





Com a evolução da técnica do NGS, conseguimos hoje sequenciar o exoma (Whole Exoma Sequence – WES) ou o genoma (Whole Genoma Sequence – WGS) dependendo da necessidade das informações que se deseja obter. De forma exemplificada WES é o sequenciamento do exoma completo, sendo possível analisar, em média, cento e oitenta mil éxons com a finalidade de buscar as variantes que podem estar relacionadas com o fenótipo patológico de um indivíduo (Rabbani, et al, 2014).

Vamos recordar?



Os éxons são as sequências de DNA transcritas em RNA e traduzidas em proteínas; os íntrons são regiões não codificantes.

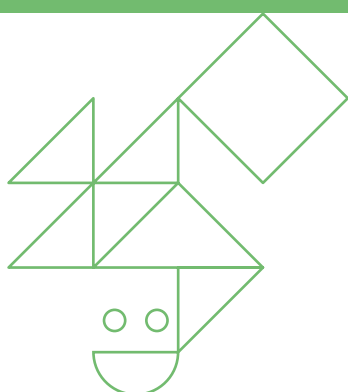
Não é necessário selecionar genes alvos pois com esse teste genético é possível ter o sequenciamento de quase todos os vinte mil genes, contribuindo para o diagnóstico de doenças que ainda não se tem uma hipótese diagnóstica bem definida ou por quadros inespecíficos que necessitem a busca de genes diferentes dos que existem em painéis comumente utilizados. Com relação ao WGS, ele é uma técnica laboratorial na qual são obtidas todas as regiões codificantes (exons) e não codificantes do genoma. Ele fornece um mapa completo e abrangente da

composição genética de uma pessoa e permite que seja realizada uma análise extensa de todos os genes (Park, et al. 2016). O sequenciamento do genoma completo é uma tecnologia de teste genético que obtém dados abrangentes sobre cada gene. Enquanto outros testes de DNA obtêm dados sobre um gene ou pontos dentro do seu DNA (microarranjos de genotipagem), o sequenciamento do genoma inteiro é diferente.

A tabela a seguir (Tabela 3) aponta algumas comparações entre O Sequenciamento Sanger e o NGS (Voelkerding, et al 2009).

Sanger	NGS
Custo mais baixo comparado com os demais	Custo mais elevado
Metodologia utilizada em variantes pontuais, regiões conhecidas e estabelecidas	Metodologia utilizada em estudos de larga escala: WGS ou WES
Sem problemas de armazenamento de dados	Grande número de dados gerados: problema de armazenamento
Análise simples, contando apenas com sequência referência	Profissional qualificado para análise dos dados

Tabela 3. Comparação entre o método de Sequenciamento Sanger e NGS.



É importante lembrar que não há superioridade entre uma técnica ou outra, uma vez que a escolha pela técnica é feita de acordo com a resposta que se busca. Muitos laboratórios utilizam a técnica de sanger para confirmar resultados de mutação pontual obtidas no NGS. É muito importante, portanto, conhecer as técnicas para que seja possível realizar a escolha adequada do exame evitando gastos desnecessários e o uso indevido de tempo frente aos pacientes que buscam respostas pela condição que estão vivenciando no processo saúde doença.

Mais do que compreender o processo de análise, é muito importante saber como os laudos são gerados e assim ter a capacidade de realizar a interpretação correta dos mesmos para que as condutas clínicas sejam realizadas de forma coerente, não causando prejuízo

ao paciente e seus familiares.

Um resultado de qualquer técnica molecular traz informações valiosas para relacionar com o fenótipo presente no indivíduo e em sua família. E essas informações vêm descritas de forma específica com linguagem científica e padronizada. Como vimos anteriormente com o cariótipo, por exemplo, ele possui uma forma específica de representar a presença de alguma alteração nos cromossomos.

A análise da sequência do DNA também possui formas padronizadas para descrever a presença de variantes e também a sua classificação sendo patogênicas, benignas ou de significado clínico desconhecido. A seguir vamos discutir o processo de análise das variantes genéticas para que a compreensão dos resultados advindos das técnicas moleculares seja adequada.

3. Análise de variantes

Classificação das variantes

Com o montante de informações advindas do NGS, os bioinformatas utilizam algoritmos para tentar explorar e compreender melhor as informações decorrentes do material genético. Para organizar todas essas informações a análise in silico é uma área da ciência que utiliza ferramentas computacionais que conseguem através de uso de banco de dados classificar os dados obtidos.

As variantes identificadas são classificadas de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Americano de Genética Médica (ACMG) (Harrison et al, 2019). Essas diretrizes possuem 28 critérios diferentes dos quais são atribuídos diferentes pesos em função das evidências disponíveis sobre a variante em questão (Amendola, et al 2020).

Vamos recordar?

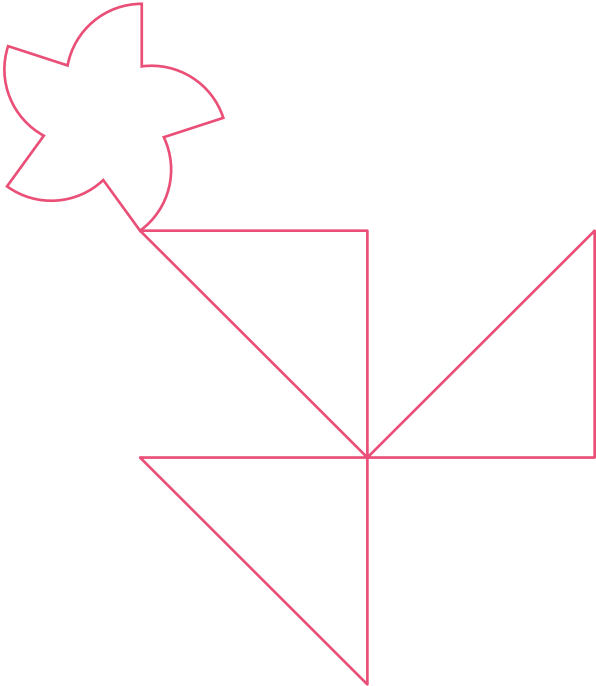
Variante genética: são alterações observadas na comparação de uma mesma região entre dois genomas. A variante é resultado de uma variação genética, um processo natural pelo qual os indivíduos se diferem, é o que nos tornam seres únicos do ponto de vista genético. O que é importante saber é se as variantes causam implicações na saúde.



Os critérios estabelecidos pela ACMG permitem avaliar a significância clínica que são descritas por cinco classes:

- **Classe 1:** Variante benigna;
- **Classe 2:** Variante provavelmente benigna;
- **Classe 3:** Variante de significado incerto;
- **Classe 4:** Variante provavelmente patogênica;
- **Classe 5:** Variante patogênica (Harrison et al, 2019).

Na tabela 4, as cinco classificações estão expostas com seus respectivos significados, auxiliando no entendimento das mesmas.



Classe	Classificação da Variante	Implicação
1	Benigna	Não geram ou não aumentam o risco de desenvolvimento de doenças.
2	Provavelmente benigna	Não é esperado que ocasionem ou que aumentem o risco de desenvolvimento de doenças.
3	Significado desconhecido	Informações disponíveis não são suficientes para que a classificação como benigna ou patogênica seja feita.
4	Provavelmente patogênica	Alta probabilidade (90%) no desenvolvimento ou ao aumento da susceptibilidade de desenvolvimento de doenças.
5	Patogênica	Associadas diretamente ao desenvolvimento ou ao aumento da susceptibilidade de desenvolvimento de doenças.

Tabela 4. Classificação das variantes e suas implicações.

A classificação da patogenicidade de uma variante é realizada através dos níveis de evidência que ela possui sendo considerados os dados populacionais, se ela já foi descrita em banco de dados e realizado análise in silico e também ensaios funcionais. Além disso, há os níveis de evidência, relacionado a análise de segregação ou se foi reportado caso de mutação de novo como também outros dados que possam estar presentes na literatura (Richards et al, 2015).

Entender a classificação das variantes permite a discussão de forma adequada dos dados, relacionando com a história pessoal e familiar, favorecendo a realização de um aconselhamento genético de forma clara e coerente frente aos conceitos moleculares e as condutas da prática clínica.

Agora que sabemos que as variantes encontradas possuem uma classificação, podemos discutir quais variantes e as implicações do ponto de vista molecular que podem ou não causar as alterações fenotípicas.

Tipos de Variantes

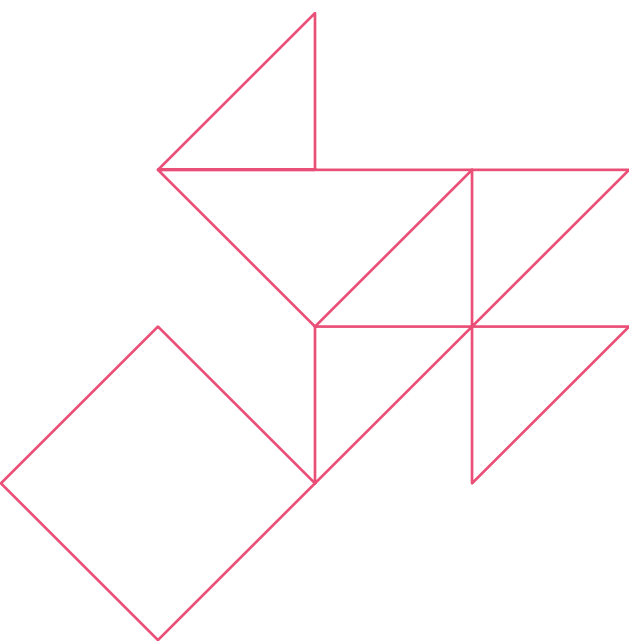
Variante de nucleotídeo único (SNV – Single nucleotide variants)

Variante de um nucleotídeo único quer dizer que há alteração de um único nucleotídeo na sequência do DNA, ocorrendo a troca de um nucleotídeo por outro. Quando há a ocorrência de uma SNV em uma região codificante (nos éxons) do gene, diferentes variantes podem ocorrer resultando em consequências diversas na proteína codificada.

Quando há uma substituição de nucleotídeos que não resulta em uma mudança no aminoácido chamamos de variante sinônima ou silenciosa. Isso pode acontecer uma vez que vários códons codificam o mesmo aminoácido e assim a proteína é codificada não perdendo a sua função. Porém, se a substituição de nucleotídeos resulta na substituição de aminoácido, podemos ter como resultado uma variante patogênica dependendo do efeito que essa substituição causa na função e estrutura da proteína, nesse caso chamamos de variantes missense ou não sinônima.

Em algumas situações a substituição de nucleotídeos pode gerar um códon de parada resultando no término prematuro proteína resultando em uma proteína, que provavelmente, não é funcional. Nesses casos as variantes são denominadas nonsense ou variante de ganho de parada.

A seguir podemos evidenciar na tabela 5, três formas dessas variantes.



	Sequência de DNA referência sem variante	Variante sinônima ou silenciosa	Variante missense ou não sinônima	Variante nonsense ou de ganho de parada
DNA				
mRNA				
Proteína codificada	Lisina 	Lisina 	Arginina 	Término da Proteína 

Tabela 5. Tipos de Variantes de nucleotídeo único e suas consequências. (Figuras adaptadas de learn.biorender.com)

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

Os SNP são alteração de um único nucleotídeo na sequência do DNA e essas alterações são encontradas em pelo menos 1% da população e são a forma mais comum de variações genéticas nos humanos.

Um indivíduo possui aproximadamente de 4 a 5 milhões de SNP em seu genoma e, dependendo em qual região um SNP pode acarretar consequências mas sabe-se que a grande maioria dos SNPs podem justificar como o organismo funciona, podem ser associados a doenças e até mesmo a ser marcadores de melhores prognósticos em algumas situações (Lopes, 2021).

Variantes Indels

As variantes Indels são as deleções e inserções de bases consecutivas na sequência do DNA. As variantes do tipo Indels são frequentes no

genoma humano depois dos SNPs que ainda são mais frequentes.

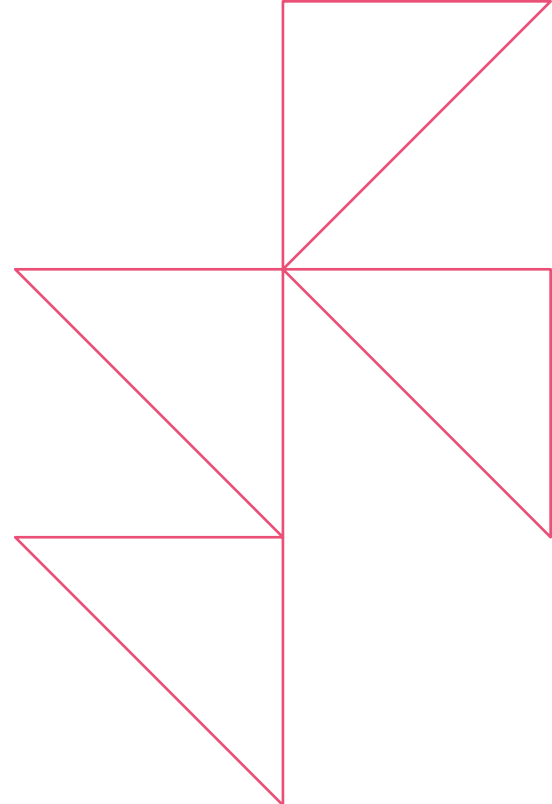
Quando essas variantes ocorrem dentro das regiões codificantes, podem causar modificações na proteína e podem ser de dois tipos, sendo as variantes com mudança no quadro de leitura (frameshift) e as variantes sem mudança no quadro de leitura (não frameshift).

As variantes frameshift ocorrem quando há uma inserção ou deleção de um número de nucleotídeos que não é múltiplo de três, afetando a leitura do código genético. Isso pode resultar na inclusão, de um stop códon (sinal de parada) ou formar um alongamento da proteína. Já as variantes indels do tipo não frameshift é quando ocorre a inserção ou deleção de nucleotídeos múltiplos de três pares de base, resultando na inserção ou deleção de um ou mais aminoácidos, mantendo a sequência da proteína inalterada.

Variação do número de cópias (CNV – Copy number variation)

As CNVs são segmentos genômicos maiores que 50pb que diferem em números de cópias e se caracterizam por duplicações (ganho de material genômico) ou deleções (diminuição de material genômico) (Zarrei et al, 2015).

Essas variações de número de cópias possuem implicações dependendo da região envolvida, podendo representar variantes benignas ou estarem associadas com doenças mais complexas, por isso é fundamental a relação fenótipo e genótipo para a melhor compreensão.



Descrição das variantes

Quando um sequenciamento é realizado, a descrição dos achados do material genético é realizada de forma padronizada e específica (den Dunnen et al, 2016).

A descrição sempre traz a localização e a consequência da alteração. Por exemplo, ao escrever c.1595G>A (p.Cys532Tyr), podemos entender que houve uma substituição da base Guanina por Adenina, no DNA (c. indica região de DNA) na região 1595 (localização), resultando na substituição dos aminoácidos, de uma Cisteína (Cys) por uma Tirosina (Tyr).

Na tabela a seguir (tabela 6) estão expostos os símbolos que podem ser encontrados com maior frequência em laudos de sequenciamento.

Local	Indicador
Para uma sequência de DNA codificadora (gene)	c.
Para uma sequência de referência genômica linear	g.
Para uma sequência de DNA mitocondrial	m.
Para uma sequência de DNA não codificante	n.
Para uma sequência de referência de RNA (transcrição)	r.
Para uma sequência de proteína	p.

Tabela 6. Indicadores da sequência referência no material genômico

Também existem códigos para determinar as alterações causadas nas variantes como substituição sendo designada por > ou deleção sendo designada por del.

Na tabela 7, podemos verificar os códigos utilizados com mais frequência e seu respectivos significados (den Dunnen et al, 2016).

Alteração	Símbolo	Explicação
Substituição (bases)	>	Utilizado para indicar substituição. Exemplo: g.12345A>T substituição de um A por T.
Intervalo	-	Indica um intervalo entre posições. Exemplo: g.12345_12678del
Mais de uma alteração em um alelo	;	Utilizada para separar variantes e alelos.
Diferentes transcritos	,	Utilizada para separar diferentes transcritos/proteínas sintetizados a partir de um alelo.
Mosaicismo	/	Indica mosaicismo.
Incerteza	?	Indica incerteza na posição do nucleotídeo ou aminoácido; Exemplo: g.(?_234567)_(345678_?)del
Sinônimo	=	Indica variante silenciosa;Exemplo: p.Fen344=
Posição de um nucleotídeo	+	Usado para numerar a posição de um nucleotídeo em relação a outro. Nucleotídeos na extremidade 5 'de um íntron são numerados em relação ao último nucleotídeo do exon diretamente a montante, seguido por um "+" (mais) e sua posição no íntron. Exemplo: c.123+45A>G
Posição de um nucleotídeo	-	Nucleotídeos na extremidade 3 'de um íntron são numerados em relação ao primeiro nucleotídeo do éxon diretamente a jusante, seguido por um "-" e sua posição fora do intron. Exemplo: c.124-56C>T
Incertezas	()	Usados para indicar incertezas e predições
Alelo	[]	Indica alelos, que inclui múltiplas sequências inseridas em uma posição e inserções de uma segunda sequência de referência.
Deleção	del	Indica uma deleção; exemplo c.356_369del
Duplicação	dup	Indica uma duplicação; exemplo: c.49dupA
Inserção	ins	Indica uma inserção; exemplo: c.39_40insG
Inversão	inv	Indica uma inversão; exemplo: c.76_83inv
Stop codon	*	Indica um códon de terminação de tradução. Exemplo: c.*43C>T ou p.Trp41*
Frameshift	fs	Indica um frameshift; Exemplo: p.Arg456GlyfsTer17
Metilação	met	Indica uma metilação

Tabela 7. Códigos mais utilizados e significados.



Considerações finais

Caro(a) aluno(a),

O conhecimento das técnicas moleculares acompanhado com as informações clínicas do indivíduo e de sua família garante um melhor aconselhamento pré e pós teste genético (Metcalf, 2017).

O acesso a essas tecnologias pode agregar de forma significativa a elaboração de estratégias de prevenção de doenças, acompanhamento adequado de indivíduos e famílias e também agrega novas informações advindas da análise de material genômico para relacionar com o fenótipo.

Em muitas situações essas tecnologias não estão disponíveis, mas, apesar disso, é possível com uma anamnese adequada, com a construção completa do heredograma, levantar suspeitas para a condução de casos que precisam da atenção voltada ao olhar da medicina genômica.

O projeto PROADI tem a intenção de difundir a informação e disponibilizar o conhecimento para levantar discussões frente às tecnologias moleculares existentes, e garantir acesso às informações de como podemos inserir todo esse conhecimento na realidade dos profissionais e da população usuário dos serviços de saúde.

Bons estudos!

Equipe Mapa Genoma Brasil

Referências

- Amendola LM, Muenzen K, Biesecker LG, et al. Variant Classification Concordance using the ACMG-AMP Variant Interpretation Guidelines across Nine Genomic Implementation Research Studies. *Am J Hum Genet*. 2020;107(5):932-941. doi:10.1016/j.ajhg.2020.09.011
- Amendola LM, Golden-Grant K, Scollon S. Scaling Genetic Counseling in the Genomics Era. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2021 Aug 31;22:339-355. doi: 10.1146/annurev-genom-110320-121752. Epub 2021 Mar 15. PMID: 33722076.
- American Medical Association. Genetic Testing. Retrieved 2019. <<https://www.ama-assn.org/delivering-care/precision-medicine/genetic-testing>>
- Burke W. Genetic testing. *N Engl J Med* 2002;347(23):1867-75.
- Costa, Caroline Christine Pincela, et al. "Aplicação da hibridização genômica comparativa no diagnóstico e prognóstico das doenças oncológicas." *Revista Cereus* 12.2 (2020): 147-162.
- den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016;37(6):564-569. doi:10.1002/humu.22981.
- Facio FM, Lee K, O'Daniel JM. A genetic counselor's guide to using next-generation sequencing in clinical practice. *J Genet Couns*. 2014;23:455-62.
- Freitas, Anderson & Pinto, Helber. (2021). Sequenciamento NGS: Status e Perspectivas. 10.51780/978-6-599-275326-04.
- Garrido-Cardenas, J., et al. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors (Basel)* 2017;17:588-603.
- Gersen, Steven, and Martha Keagle. The principles of clinical cytogenetics. Eds. Steven L. Gersen, and Martha B. Keagle. New York: Springer, 2013.
- Harrison SM, Biesecker LG, Rehm HL. Overview of Specifications to the ACMG/AMP Variant Interpretation Guidelines. *Curr Protoc Hum Genet*. 2019;103(1):e93. doi:10.1002/cphg.93
- Holtzman NA, Watson MS. Promoting safe and effective genetic testing in the United States. Final report of the Task Force on Genetic Testing. *J Child Fam Nurs* 1999;2:388-90.
- ISCN An international system for human cytogenetic nomenclature. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (eds.). Karger: Basel, 2016.
- Korf, Bruce R., Reed E. Pyeritz, and Wayne W. Grody. "Nature and frequency of genetic disease." Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics. Academic Press, 2019. 47-51.
- Lawce, Helen J., and Michael G. Brown. "Cytogenetics: an overview." *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (2017): 25-85.
- Lopes, Renan Eboli. Papel dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos miRNAs 100 e 146a como fatores prognósticos do câncer de próstata. 2021. Tese (Doutorado em Urologia) - Faculdade de Medicina, University of São Paulo, São Paulo, 2021. doi:10.11606/T.5.2021.tde-23072021-104545. Acesso em: 2023-01-03.
- Martin, Christa Lese, and Dorothy Warburton. "Detection of chromosomal aberrations in clinical practice: from karyotype to genome sequence." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 16 (2015): 309-326.
- McPherson E. Genetic diagnosis and testing in clinical practice. *Clin Med Res*. 2006 Jun;4(2):123-9. doi: 10.3121/cmr.4.2.123. PMID: 16809405; PMCID: PMC1483893
- Metcalf SA. Genetic counselling, patient education, and informed decision-making in the genomic era. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2018 Apr;23(2):142-149. doi: 10.1016/j.siny.2017.11.010. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29233487.
- Muzzey, Dale, Eric A. Evans, and Caroline Lieber. "Understanding the basics of NGS: from mechanism to variant calling." *Current genetic medicine reports* 3.4 (2015): 158-165.
- Park, Sang Tae, and Jayoung Kim. "Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing." *International neurology journal* 20.Suppl 2 (2016): S76.
- Ratan, Zubair Ahmed, et al. "Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) technique for the detection of genetic aberration in medical science." *Cureus* 9.6 (2017).
- Rabbani, Bahareh, Mustafa Tekin, and Nejat Mahdih. "The promise of whole-exome sequencing in medical genetics." *Journal of human genetics* 59.1 (2014): 5-15.

Richards, S., Aziz, N., Bale, 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, 405–423 (2015).
<<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>>

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). Proc. Nati. Acad. Sci., v. 74, n. 12, USA, December 1977

Santos, Welika Faria, et al. "Sequenciamento de dna: métodos e aplicações." Proceedings of Safety, Health and Environment World Congress. Vol. 13. 2013.

Rooney, Denise E., ed. Human cytogenetics: constitutional analysis: a practical approach. Vol. 1. Oxford University Press, USA, 2001.

Shinawi, Marwan, and Sau Wai Cheung. "The array CGH and its clinical applications." Drug discovery today 13.17-18 (2008): 760-770.

Stuppia L., et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. Int J Mol Sci , v.13, 20122012, p.3245-76

Yunis, Jorge J., and Otto Sanchez. "G-banding and chromosome structure." Chromosoma 44.1 (1973): 15-23.

van Pelt-Verkuil, Elizabeth, Alex Van Belkum, and John P. Hays. Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer Science & Business Media, 2008.

Venter, J. Craig, et al. "The sequence of the human genome." science 291.5507 (2001): 1304-1351.

Voelkerding, Karl V., Shale A. Dames, and Jacob D. Durtschi. "Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics." Clinical chemistry 55.4 (2009): 641-658.

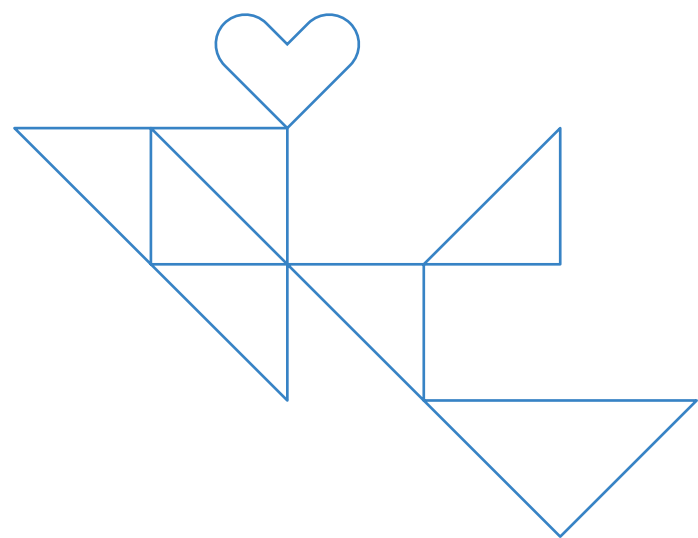
Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW (2015) A copy number variation map of the human genome. Nat Rev Genet 16:172-183

<<https://genomika.einstein.br/blog/escaneando-os-seus-cromossomos-conhe%C3%A7a-o-estudo-da-citogen%C3%A9tica-humana>> Acesso em: 158 de dezembro de 2022.

<https://medicine.uiowa.edu/humangenetics/sites/medicine.uiowa.edu/humangenetics/files/wysiwyg_uploads/IIHG_Testing_Proof3%20FINAL%202018.pdf> Acesso em 20 de dezembro de 2022.

<<https://atlasgeneticsoncology.org/teaching/30067/nomenclature-for-the-description-of-mutations-and-other-sequence-variations>> Acesso em: 22 de dezembro de 2022.

<<https://learn.biorender.com/>>





Rua Maestro Cardim, 769
01323-900 Bela Vista São Paulo
Tel. 11 3505 1000

     /bporgbr
bp.org.br