



Mapa Genoma Brasil



Coleta e Registro de Dados em Medicina Genômica

Livro 5

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

Autor

Pablo de Nicola

Equipe Qualificação e Treinamento

Amanda Aparecida Franca de Nobrega

Cristiane da Fonseca Amancio

Fernando Alves Alencar de Moura

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.



Apresentação

Olá, prezado(a) colega,

Nesta apostila, explicaremos como os testes genéticos são realizados com o objetivo de determinar, com base em análise minuciosa do nosso DNA, diagnósticos de doenças cardiovasculares ou risco elevado de desenvolver patologias crônicas. Além disso, trataremos de questões importantes como o termo de consentimento para a realização de testes genéticos, o avanço da tecnologia em relação ao sequenciamento do DNA e o impacto do resultado do teste não só para o portador de uma variante patogênica em determinado gene, mas também para a família.

É importante aprender a lidar com a complexidade de algumas situações e com o impacto emocional de um teste positivo.

Agradecemos a oportunidade de compartilhar esses conceitos com todos vocês.

Pablo de Nicola
Bons estudos!

Sumário

1. Princípios do Teste Genético 05

Cardiogenética 07

Definição do Teste Genético 08

Evolução do Teste Genético: do Teste de Genes Únicos à Avaliação do Genoma 09

2. Técnicas utilizadas no Projeto Mapa Genoma Brasil 11

Sequenciamento de Sanger 12

Sequenciamento de Próxima Geração (SPG) 14

Sequenciamento Completo do Exoma (SCE) 17

Sequenciamento Completo do Genoma (SCG) 19

Amplificação *Multiplex* de Sonda
Dependente de Ligação (MLPA) 22

3. Implicações do Teste Genético 24

Consentimento para a Realização
do Teste Genético 24

Achados Secundários ou Incidentais 27

Referências 32

Dicas

- O sumário 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 da página, você retornará ao sumário.

1. Princípios do Teste Genético

Nas últimas décadas, a comunidade científica alcançou um enorme progresso no campo da genética e da genômica humana, bem como no entendimento de sua variabilidade natural. Os estudos de decodificação do genoma, em seu sentido mais amplo, levaram à compreensão de mecanismos moleculares e de patogênese de muitas doenças, sendo, hoje, alicerces para pesquisas e desenvolvimento de novas tecnologias e tratamento (Inoue & Lupski, 2002).

Sabemos que todos somos iguais, porém há algumas diferenças. Apesar de sermos da mesma espécie, nosso DNA apresenta variantes que nos fazem únicos do ponto de vista molecular. Essas alterações genéticas podem ser mais frequentes ou raras em termos populacionais ou em determinada população. Elas estão espalhadas por todo o nosso genoma e podem estar em regiões codificantes de proteínas, regulatórias, intrônicas ou intergênicas.

O tipo mais comum de variante no genoma humano é a de uma única base, os chamados polimorfismos de base única, ou single nucleotide polymorphism (SNP). Estima-se que uma pessoa tenha de 4 a 5 milhões de SNP (Shen et al., 2013), assim como outros tipos de variações em nosso genoma, como inserções e deleções, regiões de pequenas ou grandes repetições in tandem e variantes estruturais que afetam grandes regiões cromossômicas.

Muitas dessas variantes estão localizadas em regiões genômicas não funcionais, consideradas neutras, e não causam impacto fenotípico. No entanto, quando elas ocorrem em sequências codificadoras de proteínas ou em regiões regulatórias, podem alterar a sequência de proteínas ou o nível de expressão e tradução de determinado gene, causando sérios efeitos fenotípicos (Inoue & Lupski, 2002).

O espectro de variantes genéticas que predisõem a doenças abrange desde mutações raras e altamente deletérias, responsáveis por patologias hereditárias mendelianas, até polimorfismos comuns que, sozinhos, não causam nenhum efeito, mas que, somados a outros, podem influenciar determinado fenótipo e ser um risco.

Nesse último caso, o termo “doença complexa” costuma ser usado para denotar um padrão de herança diferente do mendeliano, que ocorre em variantes altamente deletérias num único gene (Cambien & Tiret, 2007).

Na genética cardiovascular, as doenças hereditárias mendelianas são mais facilmente diagnosticadas do que doenças complexas, por serem associadas a uma variante genética única, e não a um conjunto de polimorfismos.

Essas mutações podem ser classificadas de acordo com sua consequência funcional no gene. As variantes mais frequentes são do tipo pontuais, em que ocorre a substituição de um único nucleotídeo, e podem ter três consequências: substituição de um aminoácido por outro (não sinônima), sinônima — apesar da substituição do nucleotídeo, não há alteração do aminoácido nas proteínas — e alterações do tipo nonsense em que se sinaliza um término prematuro na tradução da proteína, fazendo com que ela seja mais curta e impactando seu funcionamento.

Há também as variantes do tipo inserções ou deleções quando um ou mais nucleotídeos são adicionados ou perdidos na sequência de DNA. Uma das principais consequências desse tipo de variante é a alteração no quadro de leitura do gene, causando uma proteína não funcional (Den Dunnen et al., 2016).

Os avanços nos estudos de genes causadores de diversas patologias, não apenas cardiovasculares, levaram à necessidade da curadoria de dados de forma organizada e de fácil acesso à comunidade científica, além de padronização da interpretação de variantes genéticas e sua frequência na população mundial. Surgiram daí diversos repositórios públicos que reportam relações entre variantes genéticas e fenótipos; repositórios de dados genéticos de sequenciamento de exomas e genomas de diversas populações com dados de frequência alélica, importantes para a classificação de variantes genéticas; e algoritmos de predição de patogenicidade de variantes *in silico* que se baseiam no efeito

da variante genética para a proteína e conservação da variante entre diferentes espécies.

Em 2015, o American College of Medical Genetics and Genomics e a Association for Molecular Pathology publicaram uma diretriz com o objetivo de padronizar a classificação das variantes genéticas, antes classificadas de forma desorganizada e independente pelos grupos de pesquisa. Nesse artigo, introduziram-se terminologias padronizadas na classificação de variantes que causam doenças mendelianas: patogênicas, possivelmente patogênicas, significado incerto, possivelmente benigna e benigna. Essa classificação se baseia em dados populacionais de frequência, funcionais, computacionais e de segregação, sendo a base para a classificação de variantes até hoje (Richards et al., 2015).

A importância da classificação dessas variantes por meio de uma abordagem translacional entre pesquisa básica e clínica é muito importante. A cooperação entre médicos, geneticistas e biólogos moleculares, somada à expertise em análise de imagens e patologistas, demonstra quão necessária é uma abordagem multidisciplinar para o diagnóstico correto dessas doenças, a classificação das alterações genéticas e um melhor entendimento dos mecanismos moleculares de enfermidades genéticas. Dessa forma, estratégias farmacológicas mais eficientes e testes de novas substâncias e terapias se tornam possíveis.

Cardiogenética

A genética cardiovascular ou cardiogenética é uma subespecialidade emergente e em rápida evolução na medicina cardiovascular. Seu avanço se deu, principalmente, com as novas tecnologias do sequenciamento e a interpretação do genoma humano, com um entendimento melhor de mecanismos moleculares de várias doenças cardíacas, como arritmias, insuficiência, distúrbios lipídicos, aquelas derivadas de condições neuromusculares, aortopatias, além do uso de testes genéticos na prática clínica (Dainis & Ashley, 2018; Ahmad et al., 2019).

Antigamente, um teste genético para diagnóstico era complexo em razão do alto custo. Hoje, com a facilidade na geração de dados genéticos por meio dos sequenciamentos que utilizam tecnologias de larga escala e a grande oferta no mercado de laboratórios comerciais que disponibilizam painéis de genes e testes de exoma e genoma, o diagnóstico se tornou uma ferramenta importante para um manejo preciso de pacientes com suspeita de doenças cardiovasculares hereditárias (Otto, Savla, & Hisama, 2020).

Ao longo dos últimos anos, diversas diretrizes e consensos de prática clínica foram publicados incorporando os testes genéticos para o diagnóstico e o tratamento clínico personalizado como modelo de medicina de precisão. Nesse contexto atual, é extremamente importante que cardiologistas entendam princípios básicos de genética cardiovascular. Identificar os pacientes que podem se beneficiar do diagnóstico genético

e, consequentemente, do impacto de uma variante genética patogênica é de importante para o paciente e sua família. Além disso, a avaliação genética pode auxiliar na tomada de decisão quanto à abordagem terapêutica mais adequada, ao aconselhamento genético e à mudança de estilo de vida (Adams et al., 2016; Stiles et al., 2021; Ackerman et al., 2011).

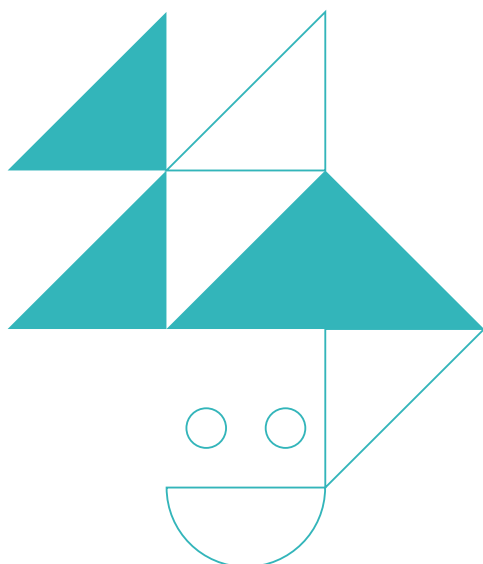
Para mais informações sobre doenças cardiovasculares, critérios para o teste genético, principais genes e implicações clínicas e terapêuticas, podem-se buscar os folders disponibilizados nas aulas iniciais sobre cada uma das doenças.



Definição de Teste Genético

O teste genético pode ser definido como o processo de análise do material genético para encontrar alterações que possam causar alguma doença ou aumentar o risco de desenvolvimento de patologias ao longo da vida (Holtzman & Watson 1999).

Essa análise visa identificar, de forma mais específica, as alterações na sequência do DNA ou na estrutura cromossômica. Além disso, é possível proceder a uma análise de RNA como resultado da expressão gênica ou por meio de análise bioquímica para medir a produção específica de proteínas (AMA, 2019). Na prática clínica, o teste genético pode ser utilizado para diagnosticar doenças em recém-nascidos, crianças ou adultos, prevendo riscos para condições específicas ou obtendo informações que possam ser usadas para personalizar tratamentos (Burke, 2002). Ele também pode ser usado para determinar filiação biológica de uma criança por meio de teste de paternidade de DNA ou para prever a ascendência de um indivíduo.



Com a difusão de testes genéticos por toda a prática clínica, podemos distingui-los de acordo com sua intenção. Veja abaixo alguns dos principais.

- 1. Teste genético clínico** – Realizado para obter o perfil genético do indivíduo como informação adicional sem uma finalidade terapêutica ou diagnóstica específica.
- 2. Teste genético de diagnóstico** – Realizado para encontrar a causa de uma doença ou sintomas presentes no indivíduo.
- 3. Teste genético pré-sintomático** – Realizado antes de o indivíduo expressar sintomas, a fim de descobrir se há risco para o desenvolvimento de certas doenças ou alguma variante que poderá ser passada a descendentes futuros.
- 4. Teste genético pré-natal** – Realizado durante a gravidez para ver se o bebê terá alguma doença.
- 5. Teste genético do recém-nascido** – Realizado 1 a 2 dias após o nascimento para ver se o bebê tem determinadas doenças.
- 6. Teste genético farmacogenômico** — Realizado para descobrir remédio e dose adequados ao indivíduo com base em suas variantes de DNA.

Evolução do Teste Genético: do Teste de Genes Únicos à Avaliação do Genoma

A busca do perfil molecular avançou de forma considerável, tanto na evolução tecnológica quanto no acesso à prática clínica, uma vez que os custos ficaram mais acessíveis.

Na década de 1970, surgiram duas técnicas que permitiram o sequenciamento de genes específicos: uma proposta por Maxam e Gilbert; a outra, por Sanger.

O aprimoramento do método de Sanger resultou nos sequenciadores automatizados, o primeiro dos quais se valeu da metodologia de Sanger et al. (1977), que sofreu algumas modificações ao longo da década de 1990.

Em 1995, foi sequenciado o genoma da bactéria *Haemophilus influenza*, o primeiro organismo de vida livre (Fleischmann et al., 1995). Nos anos seguintes, observou-se o sequenciamento de diversas espécies, como levedura, mosca-das-frutas, *Caenorhabditis elegans* e *Arabidopsis thaliana* (Brown, 2003).

No início do século XXI, tivemos o sequenciamento de genomas de mamíferos como humanos (Lander et

al., 2001), ratos (Waterston et al., 2002) e chimpanzés (Mikkelsen et al., 2005).

O sequenciamento do genoma humano teve início em 1989, por meio de um consórcio público com a participação de mais de 5 mil cientistas de todo o mundo, distribuídos em centenas de laboratórios, e com previsão de conclusão para 2005.

A Celera Genomics, empresa fundada por Craig Venter, decidiu sequenciar o genoma humano, porém com um método diferente daquele utilizado pelo consórcio público. Ela tinha como objetivo obter as sequências para patentear os genes. Em 2001, foi anunciado um primeiro rascunho do genoma humano e, em 2003, o término do projeto, que, no entanto, só foi publicado em 2007.

Desde então, a adoção de testes genéticos disparou. Grande parte dessa tendência é explicada pelo papel crítico que eles desempenham na medicina de precisão — uma abordagem de tratamento e prevenção de doenças que busca maximizar a eficácia levando em consideração a variabilidade individual em genes, ambiente e estilo de vida —, bem como pelos avanços nos métodos de sequenciamento de última geração e pelas reduções simultâneas nos custos de sequenciamento.

A figura 1 apresenta a evolução dos métodos de sequenciamento.

A figura 1 apresenta a evolução dos métodos de sequenciamento.

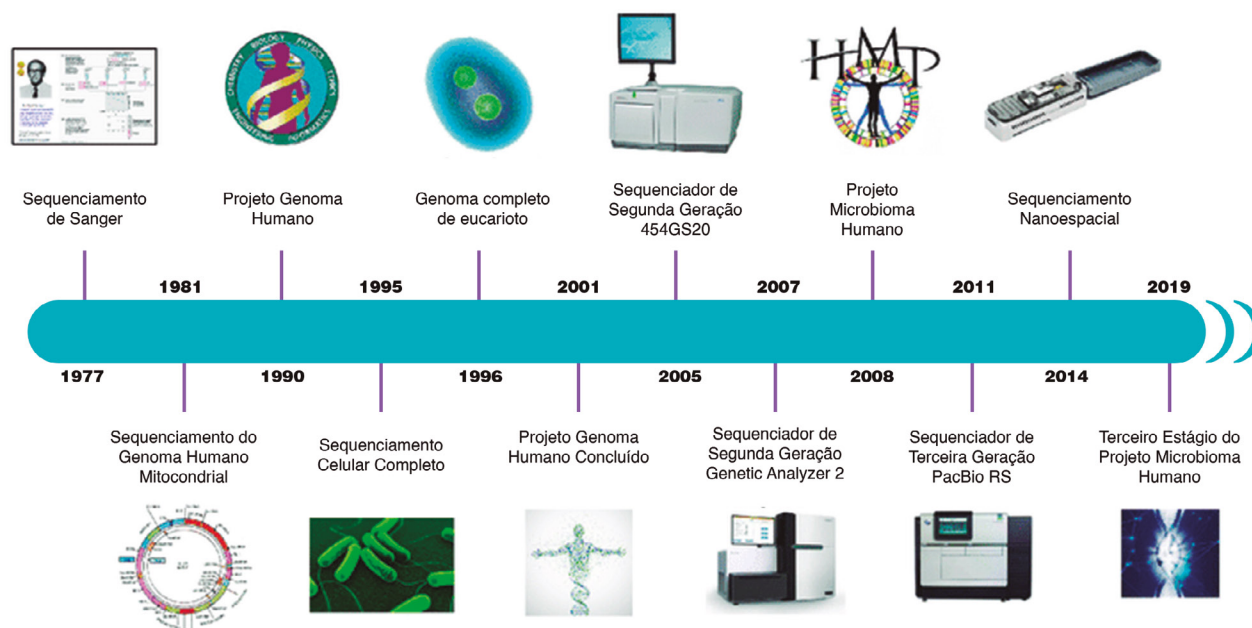


Figura 1 - Evolução dos métodos de sequenciamento. Adaptado de creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0

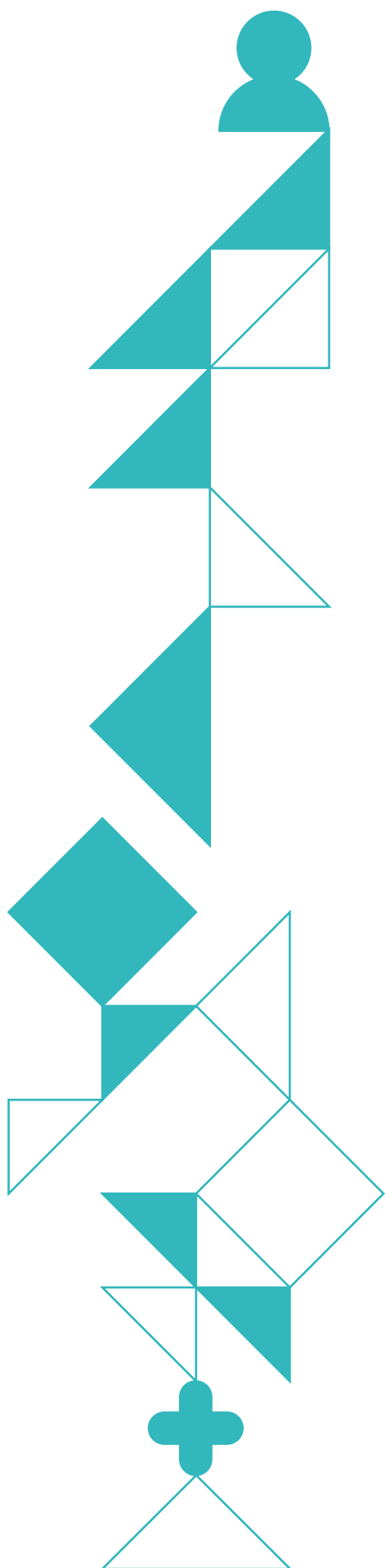
Com os avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA de última geração, hoje é possível oferecer testes simultâneos para vários genes associados a uma suscetibilidade hereditária ao câncer e a doenças cardiovasculares.

Assim, os testes genéticos evoluíram de análises de um único gene para outras mais complexas, que avaliam vários genes e variam de acordo com o que está sendo analisado — por exemplo, genes únicos, genes múltiplos, exomas ou um genoma inteiro.

Enquanto um teste de gene único é uma análise de um único gene para uma única indicação, um painel genético testa vários genes para uma indicação comum.

O sequenciamento de todo o exoma analisa todas as regiões de codificação do genoma, enquanto o sequenciamento de todo o genoma avalia regiões codificantes e não codificantes.

O termo “análise do genoma completo” se refere ao teste de todo o genoma por um amplo conjunto de métodos, incluindo sequenciamento, microarray e cariótipo (Phillips et al., 2018). Diferentes tipos de variações genéticas podem afetar a função de um gene, e várias tecnologias são usadas para identificar essa diversidade, a depender da finalidade do teste. Cada um tem seus benefícios e limitações, podendo afetar as práticas de pedidos.



2. Técnicas utilizadas no Projeto Mapa Genoma Brasil

O projeto Mapa Genoma Brasil utiliza duas técnicas de sequenciamento com propósitos distintos: a de Sanger e a de nova geração, para a AEC e AGC. Além disso, a MLPA será usada para complementar a avaliação de variações de número de cópias (VNC).

A seguir, vamos discutir essas técnicas para compreender como elas analisam o material genético e as diferenças entre essas formas de análise.

Sequenciamento Sanger

O princípio do método dideoxi, ou de Sanger, se baseia na habilidade da DNA polimerase de incorporar dideoxinucleotídeos (ddNTP), uma base análoga ao nucleotídeo que não tem o grupo 3'-hidroxil, essencial para a formação da ligação fosfodiéster durante a replicação do DNA.

Para a reação de sequenciamento por Sanger, são necessários DNA — por exemplo, genômico e fragmento de PCR —, um primer iniciador, enzima DNA polimerase, nucleotídeos (dNTP), dideoxinucleotídeos marcados de modo fluorescente com fluoróforos diferentes para base e um *buffer* de reação. Durante a reação, a DNA polimerase adiciona um desoxinucleotídeo ou o correspondente ddNTP marcado com fluoróforos diferentes em cada etapa da extensão da cadeia. Essa reação se dá num único tubo. Quando um desoxinucleotídeo (A, C, G ou T) é adicionado à extremidade 3', a extensão da cadeia pode continuar.

Quando, contudo, um dideoxinucleotídeo (ddA, ddC, ddG ou ddT) é adicionado à extremidade 3', a extensão da cadeia termina devido à falta do grupo 3'-hidroxil, essencial para a formação da ligação fosfodiéster durante a extensão. O resultado da reação de sequenciamento de dideoxi Sanger é a formação de produtos de extensão de vários comprimentos, terminados com dideoxinucleotídeos, marcados com

fluoróforos diferentes, a depender do ddNTP terminal na extremidade 3'.

Os produtos da reação de sequenciamento são separados, de acordo com o tamanho, por eletroforese capilar. Durante esse processo, um campo eletromagnético é aplicado para que o DNA carregado negativamente se mova em direção a um eletrodo positivo. A velocidade com que um fragmento de DNA se move pelo capilar é inversamente proporcional ao seu peso molecular, o que faz com que os fragmentos menores migrem mais rápido que os maiores.

Pouco antes de atingir o eletrodo positivo, os fragmentos de DNA marcados com fluorescência, separados por tamanho, atravessam um feixe de laser, o qual torna os ddNTPs dos fragmentos fluorescentes. Um dispositivo de detecção óptica do equipamento detecta essa fluorescência e converte o sinal em dados digitais. Como cada fluoróforo dos quatro ddNTP emite luz num comprimento de onda diferente quando excitado pelo laser, todas as quatro bases podem ser detectadas e distinguidas em injeção capilar. A sequência com que os ddNTPs — o que reflete no tamanho dos fragmentos gerados na reação de extensão — passa pelo laser determina a sequência do DNA de interesse.

Esse processo de eletroforese pode separar os produtos da extensão (reação de sequenciamento) por tamanho, numa resolução de uma base. Um *software*, então, converte os dados em fluorescência num cromatograma, em que cada base é identificada por uma cor.

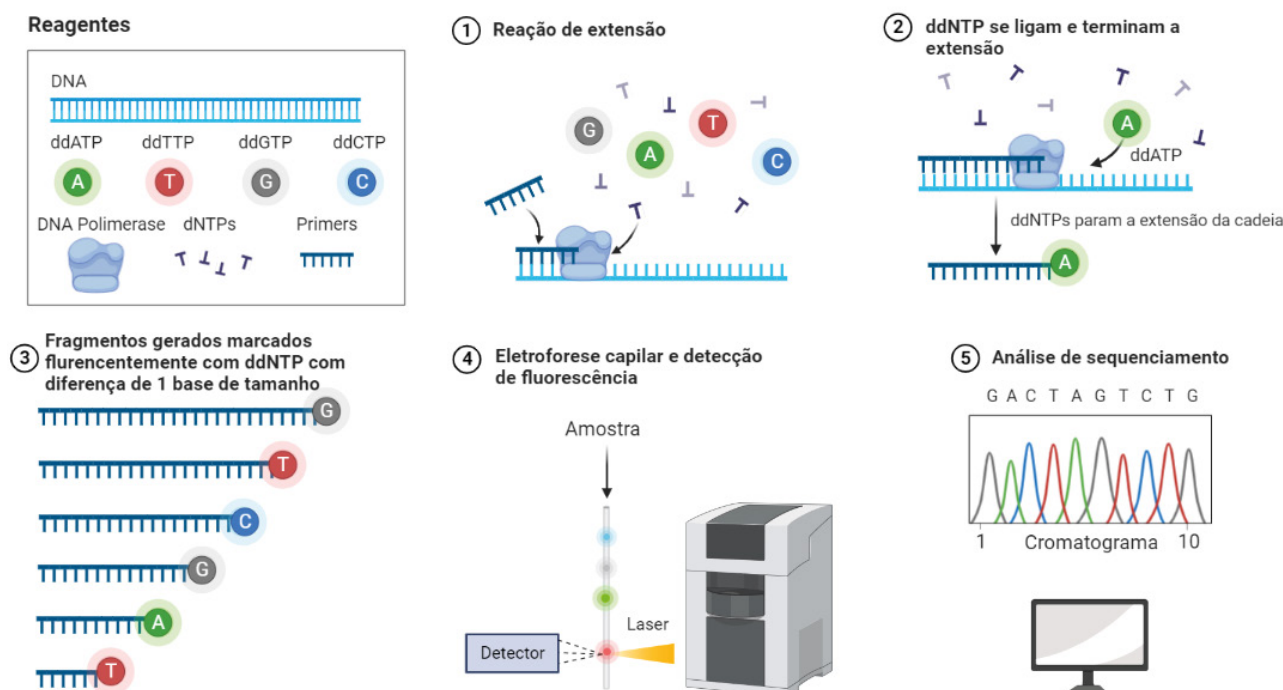


Figura 2 - Fluxo do sequenciamento pelo método de Sanger. Fonte: Elaborado com auxílio de BioRender.

Essa tecnologia foi utilizada no projeto para o sequenciamento do genoma humano. Apesar de ser considerado o padrão-ouro das técnicas de sequenciamento, ela é limitada pelo tamanho de fragmento que consegue sequenciar por reação — no máximo, mil bases — e pelo custo de sequenciamento por base, que ainda é bastante elevado. Ela ainda é muito usada para sequenciar regiões específicas do DNA, como no caso da pesquisa de uma variante de ponto. Os métodos de sequenciamento massivo mais recentes, todavia, tornaram o tempo de sequenciamento de DNA mais rápido, reduzindo os custos.

Esses métodos, também chamados de sequenciamento de larga escala ou de próxima geração, tornaram os testes de DNA em larga escala acessíveis a um público mais amplo, pois demandam apenas alguns dias para análise e produzem resultados de alta qualidade (Garrido-Cardenas et al., 2017).

Sequenciamento de Próxima Geração (SPG)

Com a publicação da primeira versão do genoma humano (Venter et al., 2001), observou-se um avanço nas tecnologias de sequenciamento.

Várias tecnologias realizam o sequenciamento do DNA em larga escala. A Roche foi a primeira empresa a desenvolver essa estratégia, baseada no chamada pirosequenciamento. Outros métodos foram desenvolvidos, como o Polony (Shendure et al., 2005), usado no sequenciador da marca SOLiD® (Applied Biosystems), e o de amplificação em ponte (Bennett et al., 2005), utilizado pelo Genome Analyser®, da Illumina. A figura 3 apresenta a evolução das tecnologias disponíveis para o SPG.

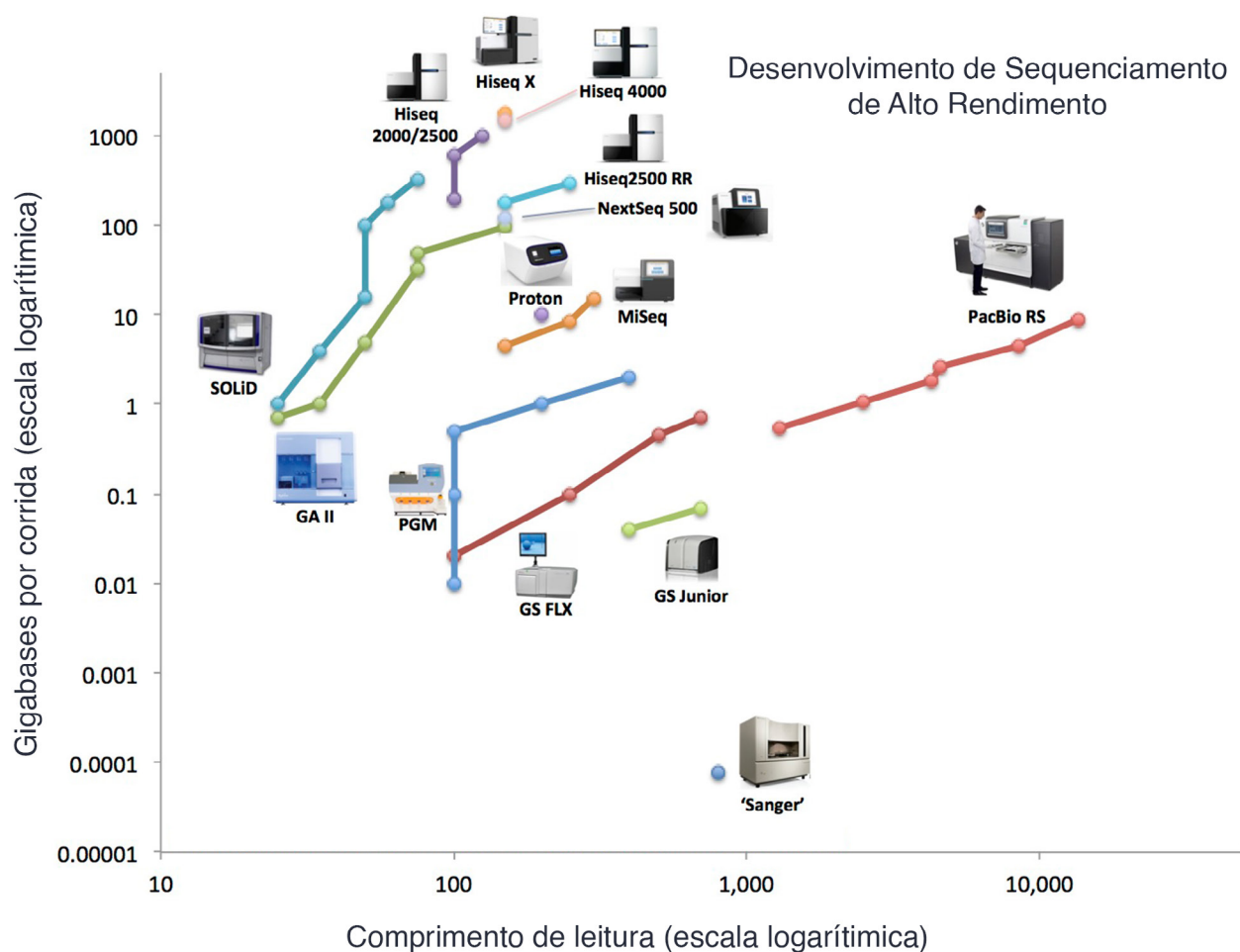


Figura 3 - Evolução das tecnologias do NGS (Next Generation Sequencing).
Adaptado de creativecommons.org/licenses/by/3.0

Hoje, a maioria dos testes tumorais e para doenças cardiovasculares geneticamente determinadas é realizada com a tecnologia de SPG. Embora o sequenciamento de Sanger de primeira geração tenha sido o padrão-ouro por anos em pesquisas e testes de laboratório clínico, o SPG suplantou o sequenciamento de Sanger para pesquisa de câncer e uso de diagnóstico complementar em oncologia clínica e cardiologia.

Os protocolos de sequenciamento de SPG envolvem a fragmentação do DNA e a ligação de sequências específicas adaptadoras nas extremidades dos fragmentos gerados, chamados de **tag**, amplificados com oligonucleotídeos específicos para as regiões adaptadoras, bem como o sequenciamento propriamente dito. No caso do Projeto Mapa Genoma Brasil, para o exoma, o **kit** de preparo de biblioteca escolhido é baseado em captura, utilizando sondas biotiniladas complementares às regiões exônicas.

A captura é feita pela hibridização das sondas com os fragmentos amplificados na etapa anterior, seguida de purificação com estreptavidina, que se liga fortemente à biotina das sondas. Esses fragmentos capturados são purificados e amplificados. Na última amplificação, são adicionados os índices nas extremidades 5' e 3' de cada fragmento.

Esses índices são sequências de DNA específicas para cada amostra e funcionam como identificadores após o sequenciamento, de forma que, após o preparo das bibliotecas, seja possível misturar as amostras para serem sequenciadas. Detalhes da técnica do sequenciamento de nova geração depende dos procedimentos fornecidos pelos fabricantes dos sequenciadores. Um dos processos está evidenciado na figura 4.

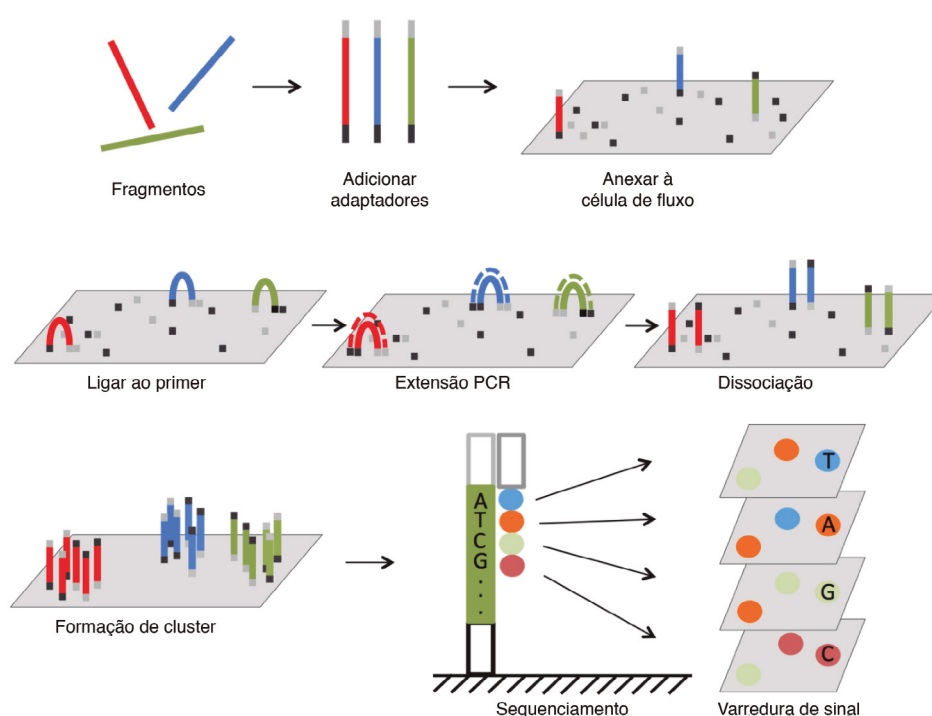
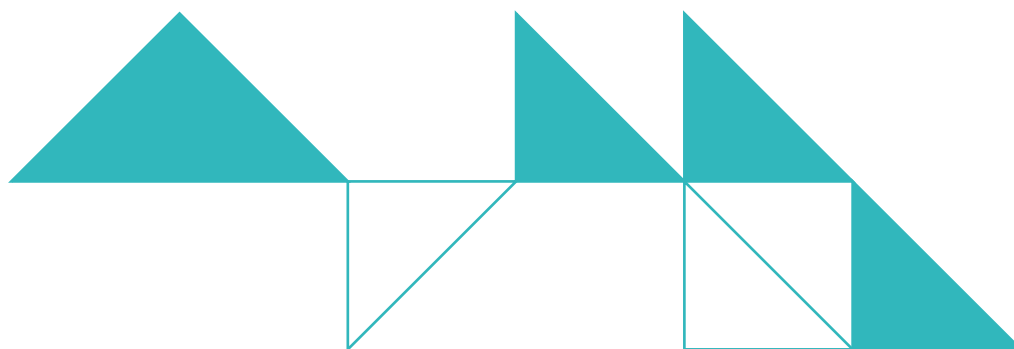


Figura 4 - Esquema do processo de sequenciamento pelo método Illumina. Fonte: Adaptado de Lu, Yuan et al. (2016).



Os adaptadores são anelados nas extremidades da sequência de fragmentos do DNA, os quais se ligam à célula de fluxo carregada com primer, e as reações de PCR em ponte amplificam cada fragmento ligado para produzir aglomerados.

Durante cada ciclo de sequenciamento, um nucleotídeo ligado ao fluoróforo é adicionado ao fio em crescimento. O laser excita os fluoróforos em todos os fragmentos sequenciados e um scanner óptico realiza a leitura.

O sequenciamento repetido ou redundante, em geral, é necessário para garantir que cada nucleotídeo de determinada posição de DNA seja sequenciado de forma suficiente, de modo a distinguir mutações verdadeiras de SPG ou artefatos que possam surgir durante a criação de bibliotecas e o próprio processo de sequenciamento (Mansfield et al., 2018).

A figura 5 apresenta aplicações do SPG.

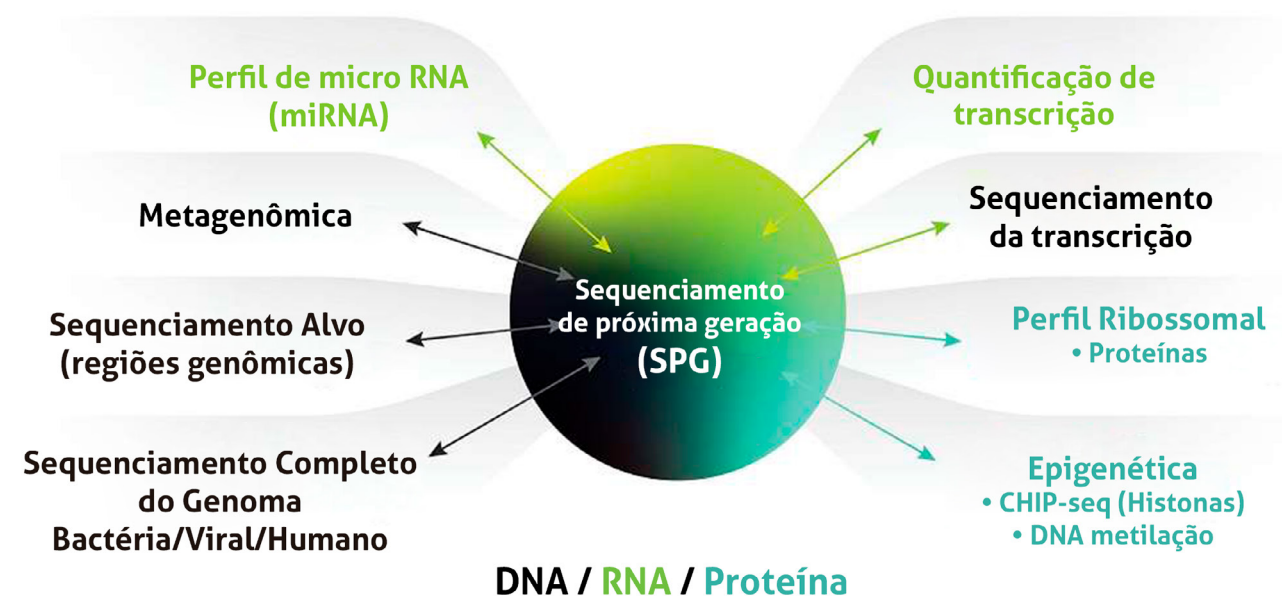


Figura 5 - Aplicações do SPG. Fonte: Adaptado de Mentja et al. (2011).

Sequenciamento Complexo do Exoma (SCE)

O Exoma é o conjunto de todas as regiões codificadoras (exons) do DNA humano. Podemos ver na figura 6 que os éxons são as sequências de DNA que são transcritas em RNA, e assim, traduzidas em proteínas para que sua função seja desempenhada.

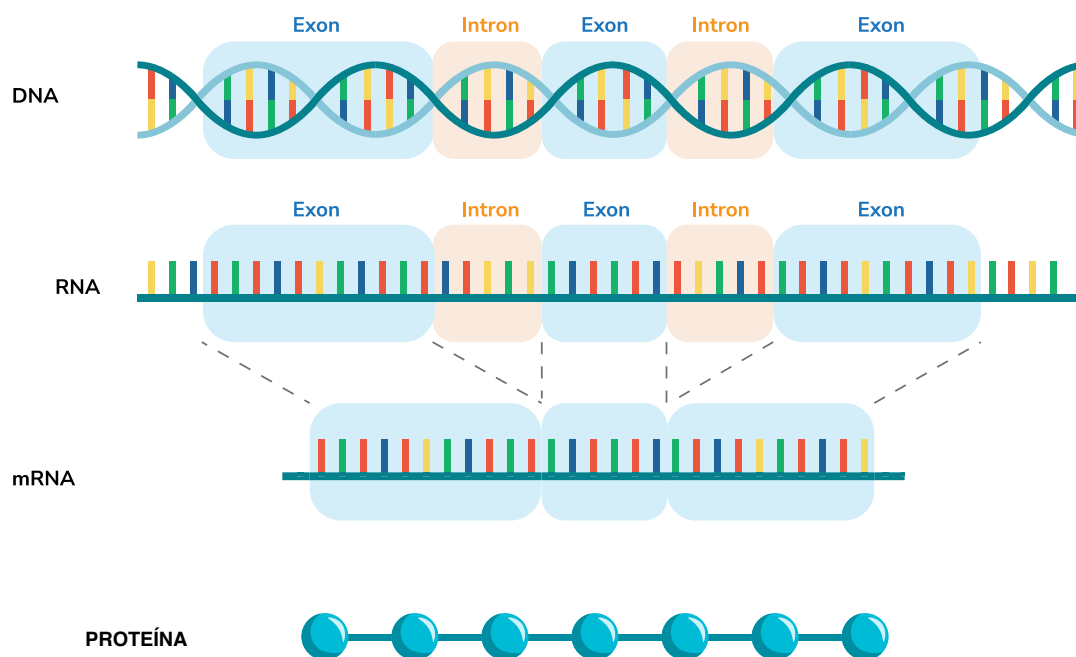


Figura 6 - Éxons e íntrons. Nota: Os éxons são as sequências de DNA transcritas em RNA e traduzidas em proteínas, enquanto os íntrons são regiões não codificantes. Fonte: Elaboração própria.



O exoma representa 1,5% do DNA total. Aparentemente pequeno em número, essa quantidade tem extrema importância, uma vez que a maioria das doenças genéticas está relacionada com variações nos éxons.

Quando realizamos o SCE, é possível analisar, em média, 180 mil éxons com a finalidade de buscar as variantes que podem estar relacionadas com o fenótipo patológico de um indivíduo. Não é necessário selecionar genes alvos, pois com esse teste genético é possível ter o sequenciamento de quase todos os 20 mil

genes, contribuindo para o diagnóstico de doenças sobre as quais ainda não se tem uma hipótese diagnóstica bem-definida ou para quadros inespecíficos que necessitem a busca de genes diferentes daqueles que existem em painéis comumente utilizados.

O SNG é usado para realizar o SCE, e detalhes desse processo dependem dos procedimentos fornecidos pelos fabricantes dos materiais. Um exemplo é mostrado na figura 7, em que podemos ver, de forma simplificada, o que acontece durante esse processo.

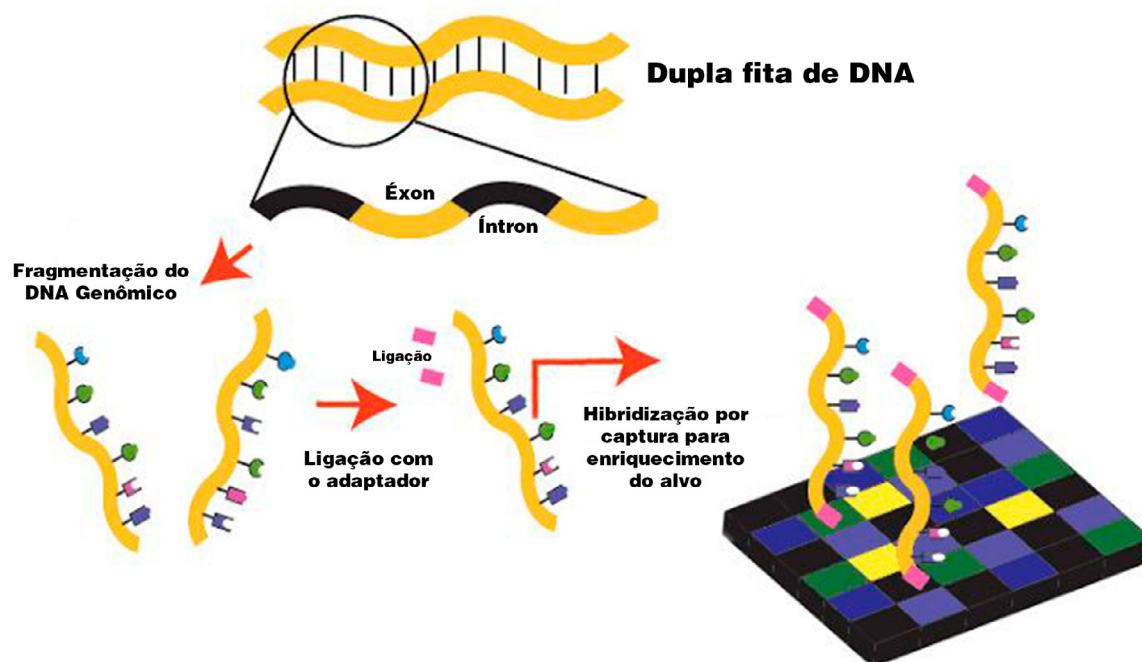


Figura 7 - SCE. Fonte: Adaptado de [creativecommons.org/licenses/by/3.0.](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)

Sequenciamento Completo do Genoma (SCG)

O sequenciamento de todo o genoma, também conhecido como SCG, é uma técnica laboratorial na qual são obtidas todas as regiões codificantes (éxons) e não codificantes do genoma. Ele fornece um mapa completo e abrangente da composição genética de uma pessoa e permite uma análise extensa de todos os genes.

Enquanto outros testes de DNA obtêm dados sobre um gene ou pontos dentro do seu DNA — microarranjos de genotipagem —, o SCG é diferente.

A figura 8 apresenta algumas das informações que podem ser obtidas pelo SCG.

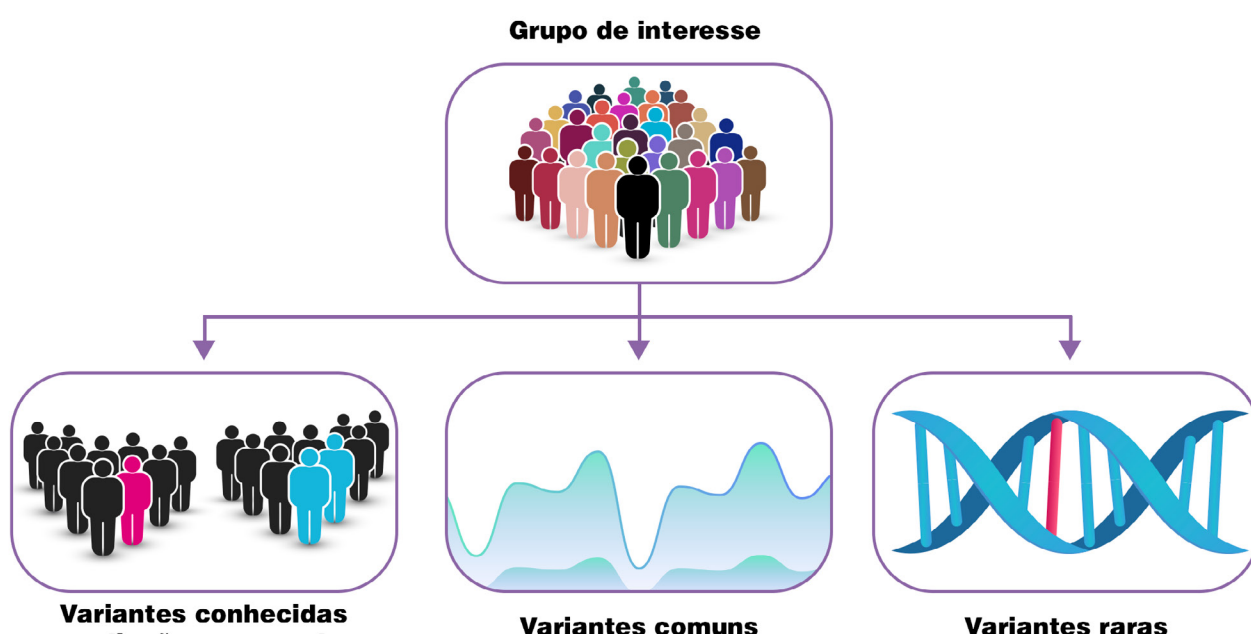
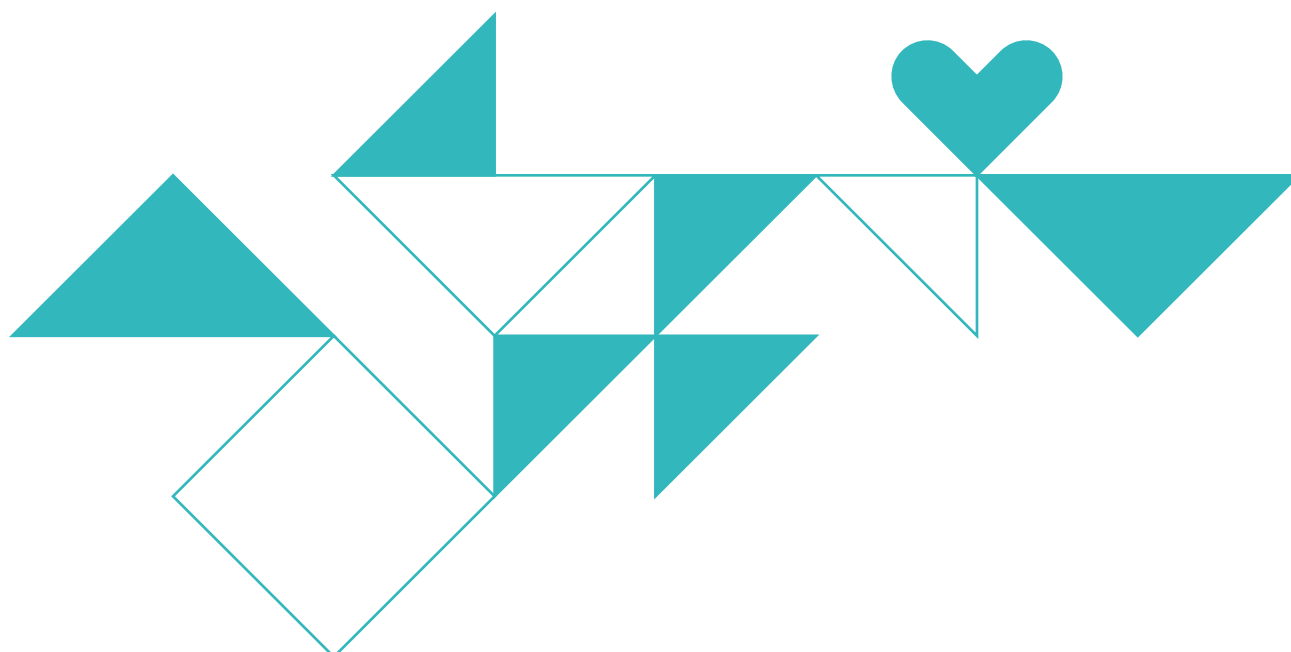


Figura 8 - Informações identificadas com o WGS. Fonte: Elaboração própria.



O SNG em pesquisas genéticas em humanos pode fornecer informações como diversidade genética, presença de elementos móveis no genoma e de genes adquiridos por transferência lateral, relações evolutivas, além de identificar variantes de diferentes tipos: ponto, inserções, deleções e número de cópias.

O processo do SCG tem as seguintes fases: sequenciamento, montagem do genoma, varredura e anotação. Um resumo está apresentado na figura 9.

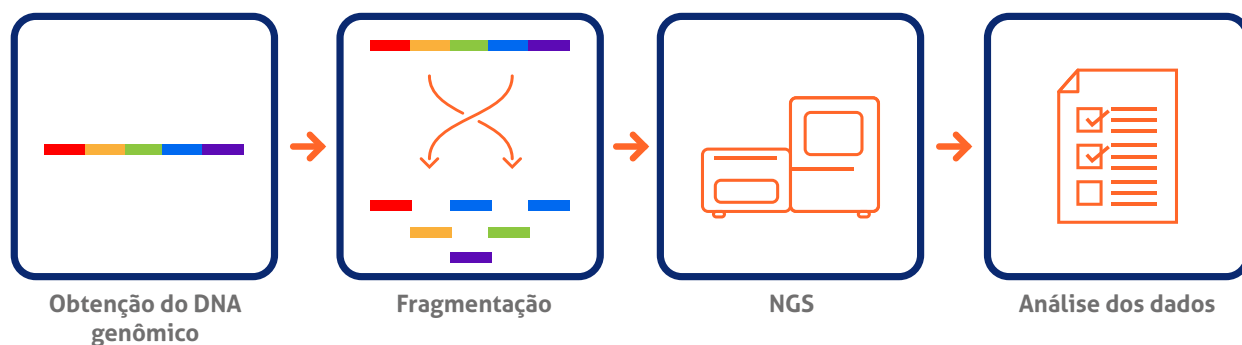
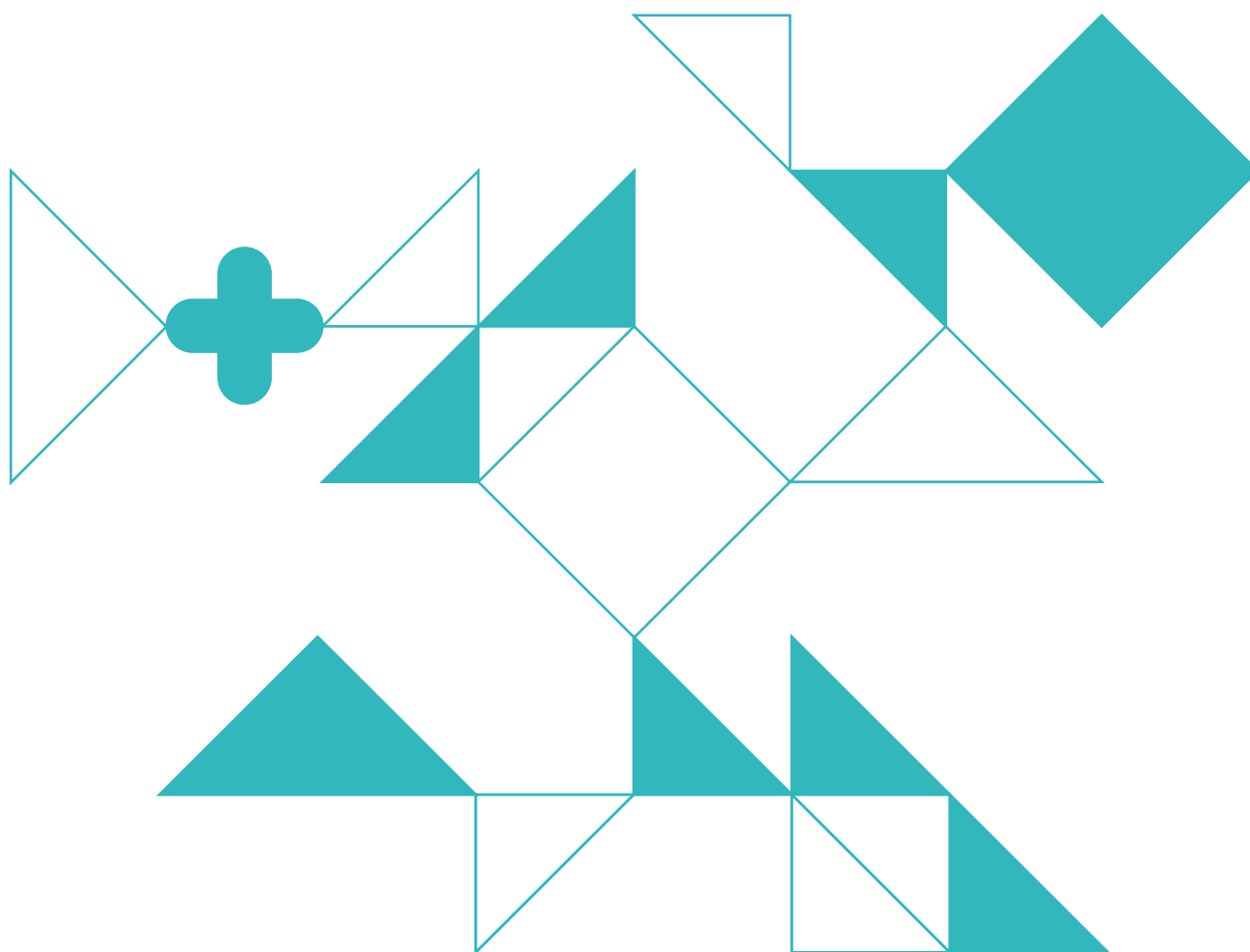


Figura 9 - Resumo das fases do WGS. Fonte: Elaborado com auxílio de BioRender.



Após obter os fragmentos pelo sequenciamento, é necessário montar o genoma, ou seja, organizar o sequenciamento. O processo é feito por programas de montagem (assemblers) que alinham os fragmentos (reads) gerados, baseando-se em regiões de sobreposição.

Antes da montagem, porém, devem ser retiradas regiões que não fazem parte do genoma, como vetores e adaptadores. Na sequência, é obtida uma sequência única para genomas circulares ou várias sequências contíguas, representando o número total de cromossomos de uma espécie. Em seguida, procede-se à predição genética, que consiste numa varredura para buscar sequências correspondentes a cada um dos genes ou de outras regiões de interesse.

Para isso, são usados programas de bioinformática que reconhecem os nucleotídeos característicos de cada elemento gênico, como regiões promotoras, junção de éxons com íntrons, códons de início e parada na tradução, e o início das regiões 5' e 3' UTR, não traduzidas.

O processo de anotação é o passo seguinte. Nesse momento, o objetivo é descobrir os diversos elementos que estão em determinado genoma, extraíndo o máximo de informação biológica. Essa anotação pode ser automática quando são utilizados programas de bioinformáticas que tenham a propriedade de anotar o conjunto gênico de um organismo de uma só vez. O outro método de anotação é manual, efetuado

pelo anotador, para cada gene, de forma separada. O mais comum é vermos os dois tipos de anotação. A base do processo é comparar a sequência de cada transcrito (ou ORF), por meio de programas de alinhamento, com os bancos de dados disponíveis.

Uma das primeiras aplicações do SCG em oncologia foi a análise de amostras de leucemia mieloide aguda com citogenética sem alterações, em 2008. Nessa época, ferramentas de bioinformática que permitiriam a análise do genoma estavam sendo criadas. Hoje, além da redução do custo para o SCG, as ferramentas de análise permitem avanços importantes (Zhao et al., 2019).

A utilização do SCG em oncologia proporciona maior compreensão da biologia do tumor, com impacto na descoberta de drogas e no sucesso de estudos clínicos, bem como na avaliação de marcadores de resposta ao tratamento (Zhao et al., 2019). O genoma do câncer tem características complexas e padrões inter-relacionados de variantes estruturais somáticas, o que expande a possibilidade de alterações direcionadoras, chamadas de driver mutations. Desde a descoberta do cromossomo Philadelphia, a caracterização de fusões em oncogenes tem sido central para o diagnóstico e o tratamento.

Além de fusões, as alterações estruturais também modulam a expressão gênica pelos rearranjos do genoma não codificante (Zhao et al., 2019).

Amplificação Multiplex de Sonda Dependente de Ligação (MLPA)

O *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA), ou amplificação multiplex de sonda dependente de ligação, é uma técnica capaz de evidenciar a falta ou o excesso de material genômico. De forma mais específica, são as alterações conhecidas como grandes deleções, amplificações e inserções no gene. O MLPA pode ser utilizado no diagnóstico molecular de diversas doenças genéticas cuja patogênese está ligada a deleções ou inserções de genes específicos.

A figura 10 apresenta a técnica de MLPA.

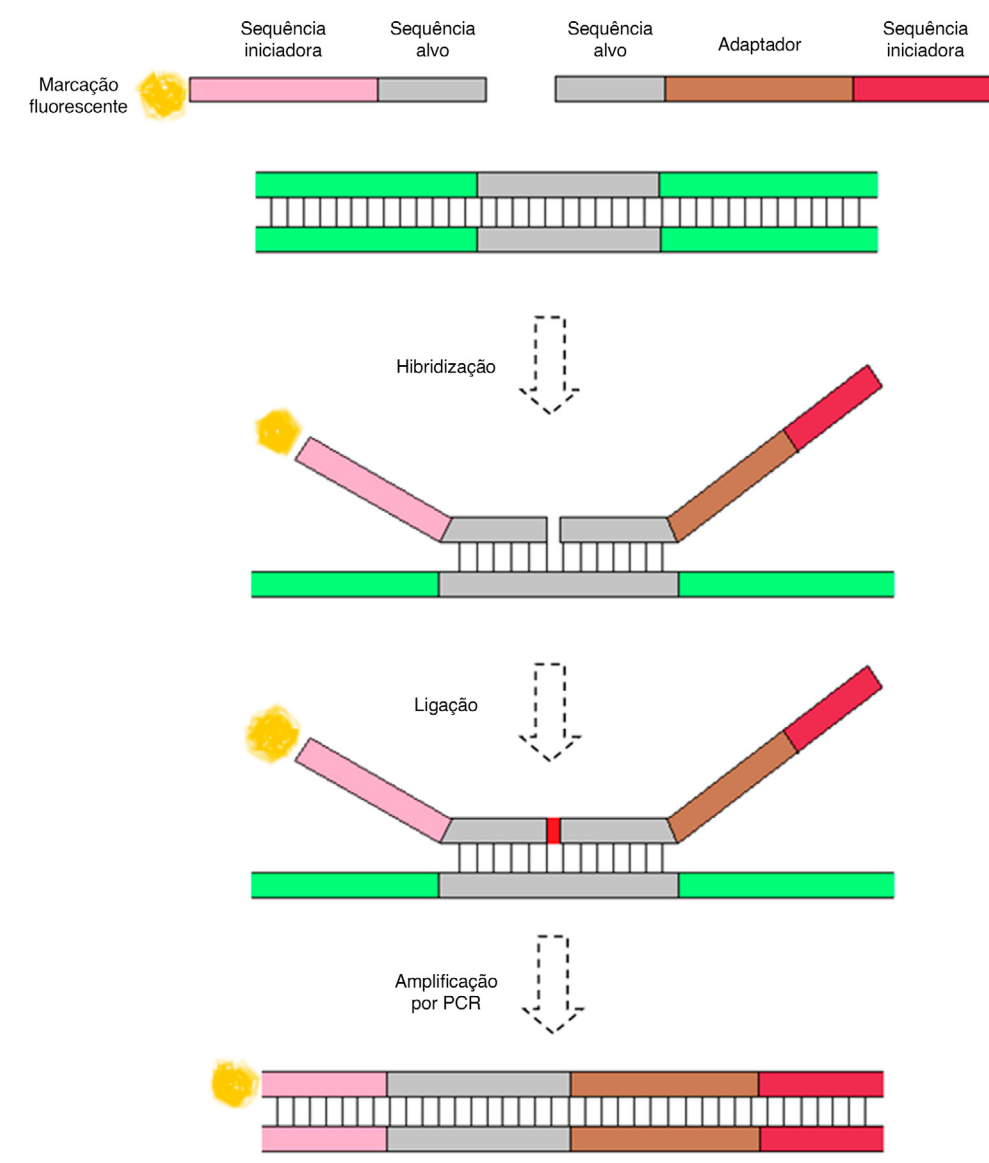


Figura 10 - Técnica de MLPA.
Fonte: Adaptado de creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0.

A correta caracterização de deleções e inserções é um ponto central para identificar a correlação genótipo-fenótipo. De fato, deleções ou inserções, de genes parciais ou inteiros, podem produzir um efeito fenotípico completamente diferente. Uma duplicação completa do gene pode levar a uma doença por causa de uma cópia extra do gene, enquanto uma duplicação parcial pode levar à perda da função dessa cópia do gene (Stuppia et al., 2012).

As variantes genéticas podem ser muito

diferentes entre si, desde alterações menores, como troca de uma única base, ou aquelas que envolvem deleções ou inserções de cromossomos, além daquelas maiores, envolvendo questões estruturais, como duplicações ou deleções de cromossomos inteiros.

Assim, os exames genéticos precisam ser diferentes entre si para poderem identificar as alterações. A tabela 1 mostra a diferença entre as técnicas que discutimos até o momento.

	MLPA	Painel de um único gene ou diversos genes	Exoma completo	Genoma completo
Análise de todos os genes conhecidos	Não	Não	Sim	Sim
Análise de grandes deleções e duplicações	Sim	Não	Não	Sim
Análise de genes clinicamente mais relevantes	Não	Sim	Sim	Sim
Análise de achados incidentais	Não	Não	Sim	Sim

Tabela 1 - Diferença entre as técnicas moleculares com relação as respectivas análises. Fonte: Elaboração própria.

Como cada exame é focado em avaliar um tipo de alteração, é importante saber o que cada uma delas trará como resposta, de modo a avaliar a necessidade de mais de uma técnica obter respostas diagnósticas.

3. Implicações do teste genético

Consentimento para a realização do teste genético

As investigações genômicas são complexas e podem produzir vários resultados ao longo do tempo, à medida que diferentes perguntas são feitas sobre os mesmos dados ou diferentes conhecimentos são utilizados no processo de interpretação.

É difícil aplicar noções de consentimento informado a uma situação em que os possíveis resultados são desconhecidos em virtude da individualidade dos dados genômicos inseridos e da complexidade de navegar por esses dados. O consentimento em medicina evoluiu amplamente em torno de cenários mais simples, como fazer ou não uma operação ou iniciar ou não uma medicação.

Os riscos, muitas vezes, são mais facilmente previstos e os resultados possíveis, mais claros. Ao tentar encaixar noções de consentimento derivadas dessas situações no cenário dos testes genômicos, encontramos várias dificuldades. Em termos legais, para que o consentimento seja válido, os pacientes precisam ser devidamente informados sobre os objetivos do teste, e o consentimento deve ser dado voluntariamente (Horton & Lucassen, 2019).

No campo dos testes genômicos, todos esses elementos estão indiscutivelmente em dúvida. Para que uma pessoa consiga

tomar uma decisão particular, ela precisa ser capaz de compreender, reter e pesar as informações necessárias para decidir e comunicar seus desejos. Nas conversas sobre consentimento, os profissionais de saúde são encarregados de fornecer aos pacientes as informações que eles desejam ou precisam para tomar uma decisão específica. Porém, no contexto da genômica, não devemos presumir que qualquer pessoa possa antecipar todas as prováveis ou sérias consequências potenciais dos testes.

Informar adequadamente uma pessoa que está tomando uma decisão sobre testes genômicos é uma tarefa desafiadora. Por exemplo, a pesquisa indica que vários participantes do Projeto 100.000 Genomas têm lembrança imprecisa sobre se escolheram ou não saber acerca dos riscos à saúde não relacionados com a condição que os levou a ingressar no projeto. O que quer que tenham escolhido, muitas pessoas presumiram que seriam informadas se algo importante fosse encontrado.

Apesar de um processo de consentimento detalhado, aquilo com que os pacientes achavam que concordavam, às vezes, era diferente do que os médicos diziam. Se o consentimento for julgado puramente pela compreensão e pela retenção de informações relevantes, não funcionou bem para esses pacientes.

Algumas pessoas querem um diagnóstico clínico, mas podem ser reticentes sobre o compartilhamento de dados. Fazer dos dois um pacote mina a voluntariedade de seu consentimento? Podemos argumentar que um genoma não pode ser interpretado isoladamente; ele se baseia na comparação com controles normais e bancos de dados

de variantes causadoras de doenças anormais, portanto o compartilhamento de dados é parte do processo de interpretação (Horton & Lucassen, 2019).

Um diagnóstico genômico faria uma grande diferença para várias pessoas e famílias, de modo que exigir que forneçam seus dados à indústria para buscar um diagnóstico desesperadamente necessário pode ser retratado como coercitivo, talvez porque mais da metade não obterá um diagnóstico por meio de testes genômicos, pelo menos em curto prazo.

A ideia de amplo consentimento ganhou força em circunstâncias em que, em virtude da incerteza e da diversidade de possíveis intervenções ou resultados, as pessoas podem consentir com base em princípios gerais que governam o que será feito, sem conhecer detalhes específicos do que será feito.

As pessoas que contribuem para os biobancos fornecem consentimento sob esse modelo, essencialmente optando por delegar decisões sobre quais pesquisas futuras serão feitas com suas amostras com base em algum conhecimento do que o processo de tomada de decisão envolveria.

O consentimento de uma pessoa pode ter implicações para outras. Ao participar de testes genômicos, uma pessoa pode encontrar informações relevantes para seus parentes biológicos.

Às vezes, isso pode estar abertamente relacionado com a detecção de uma mesma variante BRCA1 causadora de doença rara em duas primas com câncer de mama de início jovem.

Normalmente, solicitamos apenas o

consentimento da pessoa que fornece uma amostra de DNA para teste — ou de seu representante, se menor de idade ou sem capacidade. Outros membros da família que podem ser diagnosticados pelo teste não são questionados, embora, em certas circunstâncias, essa possibilidade seja explorada detalhadamente como parte do processo de consentimento.

O resultado genômico de uma pessoa, muitas vezes, está ligado ao de seus parentes biológicos, a despeito de ser confortável ou conveniente do ponto de vista social. As noções de consentimento que conceituam os pacientes como inteiramente separados de sua família biológica são, portanto, passíveis de falhar.

Consideramos que as informações genéticas hereditárias devem ser confidenciais para as famílias, e não para os indivíduos, se bem que as consequências pessoais para determinada pessoa devam ser confidenciais apenas para ela (Horton & Lucassen, 2019).

É importante explorar isso antes dos testes genômicos, em parte para evitar as situações muito raras em que os pacientes não estão dispostos a compartilhar informações genéticas relevantes para a saúde com seus parentes biológicos, mas também para considerar como essa comunicação pode ser realizada, se necessário. Ao oferecer testes genômicos a uma pessoa, temos de estar cientes de que estamos testando outras pessoas sem consentimento.

Outro aspecto que requer um tratamento particularmente cuidadoso é a possibilidade de a interpretação do teste

genômico evoluir ou ser derrubada à medida que o conhecimento científico avança. As discussões de consentimento precisam trilhar um equilíbrio delicado entre deixar as coisas em aberto, de modo que os pacientes estejam cientes de que as coisas podem mudar, e não gerar uma expectativa de que os dados genômicos serão examinados rotineiramente e que os pacientes serão atualizados.

Muitas vezes, há falta de clareza sobre quem pode ser responsável por contatar novamente os pacientes se novas informações surgirem. Qualquer responsabilidade está entre os pacientes e os profissionais de saúde, com um resultado provável de que, em alguns casos, ninguém a vê como sua responsabilidade, portanto o contato nunca acontece (Horton & Lucassen, 2019).

Dadas a complexidade e a natureza evolutiva da interpretação de testes genômicos, o consentimento pode ser conceitualmente útil como uma conversa contínua, em que aspectos da discussão são revisitados, conforme necessário, ao longo da vida de uma pessoa. No entanto, em vez de confiar no consentimento para fazer todo o trabalho, precisamos estar situados num sistema confiável, em que os pacientes possam ter confiança de que seus dados genômicos serão tratados com cuidado e que suas preferências serão acomodadas o máximo possível, sem a necessidade de especificar antecipadamente o que será procurado.

Encontrar um equilíbrio adequado entre reabrir as discussões quando necessário e se intrometer inesperadamente na vida das pessoas para fazer perguntas

indesejadas é algo difícil. Essa abordagem, todavia, nos aproximaria de respostas para toda e qualquer pergunta subsequente, observando qualquer formulário que o paciente preencheria (Horton & Lucassen, 2019).

Assim, os testes genômicos apresentam um desafio às noções tradicionais de consentimento e autonomia: como uma pessoa pode consentir num processo em que os resultados potenciais são tão desconhecidos e imprevisíveis, determinando como seu genoma é testado, quando os interesses de seus parentes biológicos podem ser inextricavelmente dependentes de suas decisões? Nossos conceitos de consentimento e autonomia precisam se expandir para se adequarem ao propósito na era da genômica.

O consentimento para testes genômicos precisa ser considerado mais amplo do que específico, parte de uma conversa em andamento com espaço para abrir mais discussões, quando necessário, em vez de ser pensado como um evento bloqueado no tempo. Os conceitos relacionais de autonomia oferecem uma forma mais frutífera de se envolver com as realidades dos testes genômicos.

Em nível biológico, uma pessoa compartilha seu código genético com parentes próximos; em nível social, uma pessoa que opta por se submeter a testes genômicos se envolve num processo que exige que outros usem sua experiência e habilidade para interpretar o código genético desse indivíduo. Considerar como podemos fortalecer as redes e os relacionamentos que facilitam as escolhas em relação aos testes genômicos é um aspecto importante

para aumentar a autonomia e um pré-requisito de preparação ética para a era genômica (Horton & Lucassen, 2019).

Achados Secundários ou Incidentais

O crescente uso de ferramentas genômicas, como sequenciamentos de genoma e do exoma, levantam questões importantes sobre como lidar com informações genômicas relacionadas com a saúde que podem fornecer dados sobre predisposição genética a alguma doença, mas não estão ligadas às razões pelas quais o teste foi solicitado.

As questões sobre se e como divulgar esses achados secundários, também chamados de incidentais, de testes genéticos geraram muito debate. Basicamente, trata-se de variantes genéticas encontradas num gene não relacionado com o quadro clínico do paciente e a intenção primária do teste genético. Por exemplo, uma paciente com hipertrofia cardíaca familiar e histórico de morte súbita na família fez um exoma para pesquisa de variantes genéticas associadas à cardiomiopatia hipertrófica. No seu laudo genético vieram reportadas duas variantes: uma patogênica no gene MYH7, que causa cardiomiopatia hipertrófica, e outra patogênica no gene BRCA2, que aumenta a predisposição de câncer de mama e ovário. Por que a variante no BRCA2 foi reportada?

O Colégio Americano de Genética Médica e Genômica publicou, em 2015, recomendações para achados incidentais em exomas e genomas clínicos baseadas

na acionabilidade médica associada à predisposição de determinada condição, ou seja, caso o paciente se beneficiasse daquela informação genética, seria possível tomar medidas preventivas ou terapêuticas.

Um achado incidental significa que o paciente apresenta um risco maior de desenvolver uma condição médica específica, porém não significa que vai desenvolvê-la definitivamente.

Os achados incidentais são reportados apenas em genes recomendados pelo consenso do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica.

Desde a publicação dessa recomendação, a lista de genes de achados incidentais foi atualizada à medida que o estudo de associação de genótipos e fenótipos foi aumentando, e cada vez mais se conhecem genes associados a um pior diagnóstico ou desenvolvimento de tratamentos gene-específicos (Green et al., 2013; Kalia et al., 2017; Miller et al., 2021; 2022).

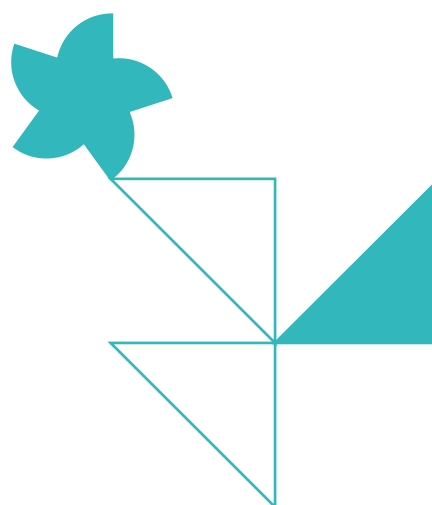


Tabela 2 - Genes de achados incidentais recomendados pela ACMG SF3.1

Genes relacionados a câncer				
Fenótipo	ACMG SF Versão da lista	Gene	Modo de herança	Variantes para reportar
Polipose Adenomatosa Familiar	1.0	APC	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Câncer medular de tireóide familiar	1.0	RET ^b	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome hereditária para câncer de mama e ovário	1.0	BRCA1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	BRCA2		
	3.0	PALB2		
Feocromocitomas-paraganglioma hereditário	1.0	SDHD	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	SDHAF2		
	1.0	SDHC		
	1.0	SDHB		
	3.0	MAX		
	3.0	TMEM127		
Síndrome da Polipose Juvenil	2.0	BMPR1A	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	2.0	SMAD4 ^c		
Síndrome de Li-Fraumeni	1.0	TP53	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome de Lynch	1.0	MLH1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
		MSH2		
		MSH6		
		PMS2		
Neoplasia endócrina múltipla tipo I	1.0	MEN1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome de polipose de MUTYH	1.0	MUTYH	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
Neurofibromatose tipo 2	1.0	NF2	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome de Peutz-Jeghers	1.0	STK11	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Síndrome do tumor hamartoma-PTEN	1.0	PTEN	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Retinoblastoma	1.0	RB1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Complexo da esclerose tuberosa	1.0	TSC1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	TSC2		
Síndrome de von Hippel-Lindau	1.0	VHL	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Tumor de Wilms 1	1.0	WT1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas

Genes associados a fenótipos cardiovasculares

Fenótipo	ACMG SF Versão da lista	Gene	Modo de herança	Variantes para reportar
Aortopatias	1.0	FBN1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	TGFBR1		
	1.0	TGFBR2		
	1.0	SMAD3		
	1.0	ACTA2		
	1.0	MYTH11		
Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (uma subcategoria de Cardiomiopatia arritmogênica)	1.0	PKP2	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	DSP		
	1.0	DSC2		
	1.0	TMEM43		
	1.0	DSG2		
Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica	1.0	RYR2	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	3.0	CASQ2	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
	3.0	TRDN	Autossômica recessiva	
Cardiomiopatia dilatada	1.0	TNNT2	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	LMNA		
	3.0	FLNC		
	3.0	TTN		
	3.1	BAG3		
	3.1	DES		
	3.1	RBM20		
	3.1	TNNC1		
Síndrome de Ehlers-Danlos, tipo	1.0	COL3A1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	LDLR	SD	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	APOB	Autossômica dominante	
	1.0	PCSK9	Autossômica dominante	
Cardiomiopatia hipertrófica	1.0	MYH7d	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	MYBPC3		
	1.0	TNNI3		
	1.0	TPM1		
	1.0	MYLE		
	1.0	ACTC1		
	1.0	PRKAG2		
	1.0	MYL2		
Síndrome do QT longo tipos 1 e 2	1.0	KCNQ1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	KCNH2		
Síndrome do QT longo 3, síndrome	1.0	SCN5A ^d	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas

Genes associados a erros inatos do metabolismo

Fenótipo	ACMG SF Versão da lista	Gene	Modo de herança	Variantes para reportar
Deficiência de biotinidase	3.0	BTD	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
Doença de Fabry	1.0	GLA	Ligada ao Cromossomo X	All hemi, het, homozygous P and LP
Deficiência da ornitina transcarbamilase	2.0	OTC	Ligada ao Cromossomo X	All hemi, het, homozygous P and LP
Doença de Pompe	3.0	GAA	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)

Genes relacionados a fenótipos diversos

Fenótipo	ACMG SF Versão da lista	Gene	Modo de herança	Variantes para reportar
Hemocromatose hereditária	3.0	HFE	Autossômica recessiva	Apenas HFE p.C282YI homozigoto
Telangiectasia hemorrágica hereditária	3.0	ACVRL1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	3.0	ENG		
Hipertermia maligna	1.0	RYR1	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
	1.0	CACNA1S		
Diabetes de início na maturidade dos jovens	3.0	HNF1A	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas
Retinopatia associada a RPE65	3.0	RPE65	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
Wilson disease	2.0	ATP7B	Autossômica recessiva	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas (2 variantes)
Amiloidose hereditária TTR	3.1	TTR	Autossômica dominante	Todas patogênicas e possivelmente patogênicas

Fonte: Elaboração própria.

Como proceder nesses casos?

No primeiro atendimento do paciente com o assistente de pesquisa do projeto, esse assunto deve ser abordado, explicando ao participante que existe a possibilidade de serem encontrados achados incidentais. Ele deve optar por querer ou não ser notificado caso isso aconteça.

Segue abaixo um trecho do TCLE do projeto:

O teste genético consiste na análise de centenas de genes do seu DNA para a busca de alterações que possam estar relacionadas com as doenças cardiovasculares que estudamos. Durante essa análise, a equipe do projeto pode encontrar alterações em genes que não estavam procurando; isso se chama "achado incidental". Esses achados inesperados não estão diretamente relacionados com o estudo, no entanto, podem indicar alguma informação importante sobre a sua saúde. Por vezes os pesquisadores podem não saber o significado de um achado nem como ele pode afetar a sua vida ou a sua saúde de uma maneira geral.

Pode ser um benefício saber o resultado dos achados incidentais. Por exemplo, eles podem indicar o risco de desenvolver uma doença. Em alguns casos, isso permite tomar medidas para reduzir o seu risco e em outros casos, a informação pode ajudá-lo a tomar decisões na sua vida. Entretanto, receber informação inesperada sobre a sua saúde pode causar-lhe um grande desconforto emocional. Isso pode dar-se particularmente no caso de saber que tem ou pode desenvolver um problema para o qual não há tratamento ou cura. A opção de ter acesso a informação sobre os achados incidentais é exclusivamente sua. De qualquer forma, a equipe do projeto estará disponível para esclarecer todas as dúvidas sobre os achados incidentais e sobre como você deve proceder caso algum achado seja encontrado.

Você gostaria de ser notificado e receber um laudo com as informações de achados incidentais, caso esses sejam encontrados durante seu teste genético?

() Sim () Não

Após a realização do teste genético, você receberá o seu laudo impresso com o resultado da análise e um profissional da saúde participante do projeto prestará todas as informações sobre o resultado e estará disponível para tirar todas as dúvidas que você tiver.

Caso o participante queira ser informado acerca de achados secundários, essa informação constará em seu laudo e será realizado um aconselhamento genético sobre a questão. Se optar por não ser informado, os achados secundários não serão passados a ele. As implicações clínicas devem ser discutidas em consulta de aconselhamento genético com um especialista.

Referências

- Ackerman, M. J. et al. (2011) 'HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA).', Heart rhythm. Elsevier Inc., 8(8), pp. 1308–39. doi:10.1016/j.hrthm.2011.05.020.
- Adams, D. et al. (2016) 'First European consensus for diagnosis, management, and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy.', Current opinion in neurology. Wolters Kluwer Health, 29 Suppl 1(Suppl 1), pp. S14–26. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000289.
- Ahmad, F. et al. (2019) 'Establishment of Specialized Clinical Cardiovascular Genetics Programs: Recognizing the Need and Meeting Standards: A Scientific Statement From the American Heart Association', Circulation. Genomic and precision medicine. NLM (Medline), 12(6), p. e000054. doi:10.1161/HCG.0000000000000054.
- American Cancer Society. www.cancer.org/healthy/cancer--causes/genetics/genetic-testing-for-cancer-risk/understanding-genetic-testing-for-cancer.html. Acesso em: 26 ago. 2022.
- 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.
- Cambien, F. and Tiret, L. (2007) 'Genetics of cardiovascular diseases: From single mutations to the whole genome', Circulation. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1714–1724. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.661751.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. Nature 2014;511:543–50.
- Carvalho CM, Zhang F, Lupski JR. Evolution in health and medicine. Sackler colloquium: Genomic disorders: a window into human gene and genome evolution. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107 (Suppl 1): 1765–71.
- Dainis, A. M. and Ashley, E. A. (2018) 'Cardiovascular Precision Medicine in the Genomics Era', JACC: Basic to Translational Science. Elsevier Inc, pp. 313–326. doi: 10.1016/j.jacbs.2018.01.003.
- den Dunnen, J. T. et al. (2016) 'HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update.
- 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. <https://sequencing.com/education-center/whole-genome-sequencing>. Acesso em: 27 jul. 2022.
- Green, R. C. et al. (2013) 'ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing', Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics. NIH Public Access, 15(7), p. 565. doi: 10.1038/GIM.2013.73.
- 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.
- Horton, R., Lucassen, A. Consent and Autonomy in the Genomics Era. Curr Genet Med Rep 2019;7:85–91.
- Human Mutation. John Wiley and Sons Inc., 37(6), pp.564–569. DOI: 10.1002/humu.22981.
- Inoue, K. and Lupski, J. R. (2002) 'Molecular mechanisms for genomic disorders', Annual Review of Genomics and Human Genetics. Annu Rev Genomics Hum Genet, pp. 199–242. doi:10.1146/annurev.genom.3.032802.120023.
- Kalia, S. S. et al. (2017) 'Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics', Genetics in Medicine. Nature Publishing Group, 19(2), pp.249–255. DOI: 10.1038/gim.2016.190.
- Khoo C, Rogers TM, Fellowes A, Bell A, Fox S. Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond. Transl Lung Cancer Res. 2015 Apr;4(2):126–41. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.01.10. PMID: 25870795; PMCID: PMC4384221.
- Li H, Liu ZY, Wu N, Chen YC, Cheng Q, Wang J. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. Mol Cancer. 2020 Jun 20;19(1):107. doi:10.1186/s12943-020-01227-0. PMID: 32563252; PMCID: PMC7305609.
- Lu, Yuan, et al. "Next generation sequencing in aquatic models." Next Generation Sequencing-Advances, Applications and Challenges 1 (2016): 13.

Lynce, F., Isaacs, C. How Far Do We Go with Genetic Evaluation? Gene, Panel, and Tumor Testing. Am Soc Clin Oncol Educ Book 2016;35:72-8.

Mansfield, A., et al. Identification, Prioritization, and Treatment of Mutations Identified by Next-Generation Sequencing. Am Soc Clin Oncol Educ Book, v.38, 2018, p.873-880.

Miller, D. T. et al. (2021) 'ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)', Genetics in Medicine. Elsevier, 23(8), pp. 1381–1390. DOI: 10.1038/S41436-021-01172-3.

Miller, D. T. et al. (2022) 'ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)', Genetics in Medicine. Elsevier, 24(7), pp. 1407–1414. doi: 10.1016/J.GIM.2022.04.006.

Nakagawa H, Fujita M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. Cancer Sci 2018;109(3):513-22.

Otto, C. M., Savla, J. J. and Hisama, F. M. (2020) 'Cardiogenetics: A primer for the clinical cardiologist', Heart. BMJ Publishing Group, 106(12), pp. 938–947. doi: 10.1136/heartjnl-2019-316241.

Phillips, K., et al. Genetic Test Availability and Spending: Where Are We Now? Where Are We Going? Health Aff (Millwood) 2018;35:710-6.

Pritchard D, Goodman C, Nadauld LD. Clinical Utility of Genomic Testing in Cancer Care. JCO Precis Oncol 2022;6:e2100349. <https://www.cd-genomics.com/blog/sanger-sequencing-introduction-principle-and-protocol>. Acesso em: 28 jul. 2022.

Richards, S. et al. (2015) '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'. doi: 10.1038/gim.2015.30.

Robson M, et al. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. J Clin Oncol 2015;1:3660-7. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genetic-Testing>. Acesso em: 27 jul. 2022.

Schienda J, Stopfer J. Cancer Genetic Counseling-Current Practice and Future Challenges. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020 Jun 1;10(6):a036541. doi: 10.1101/cshperspect.a036541. PMID: 31548230; PMCID: PMC7263095.

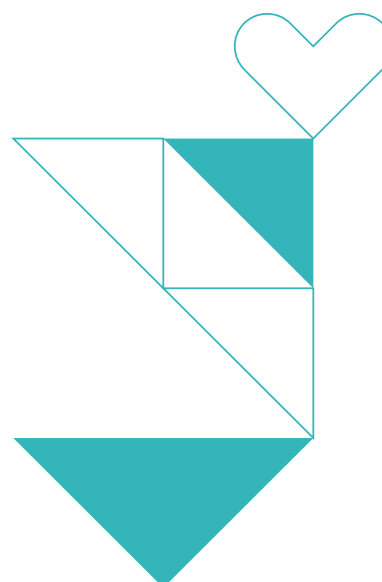
Shen, H. et al. (2013) 'Comprehensive Characterization of Human Genome Variation by High Coverage WholeGenome Sequencing of Forty Four Caucasians', PLoS ONE. Public Library of Science, 8(4). doi:10.1371/journal.pone.0059494.

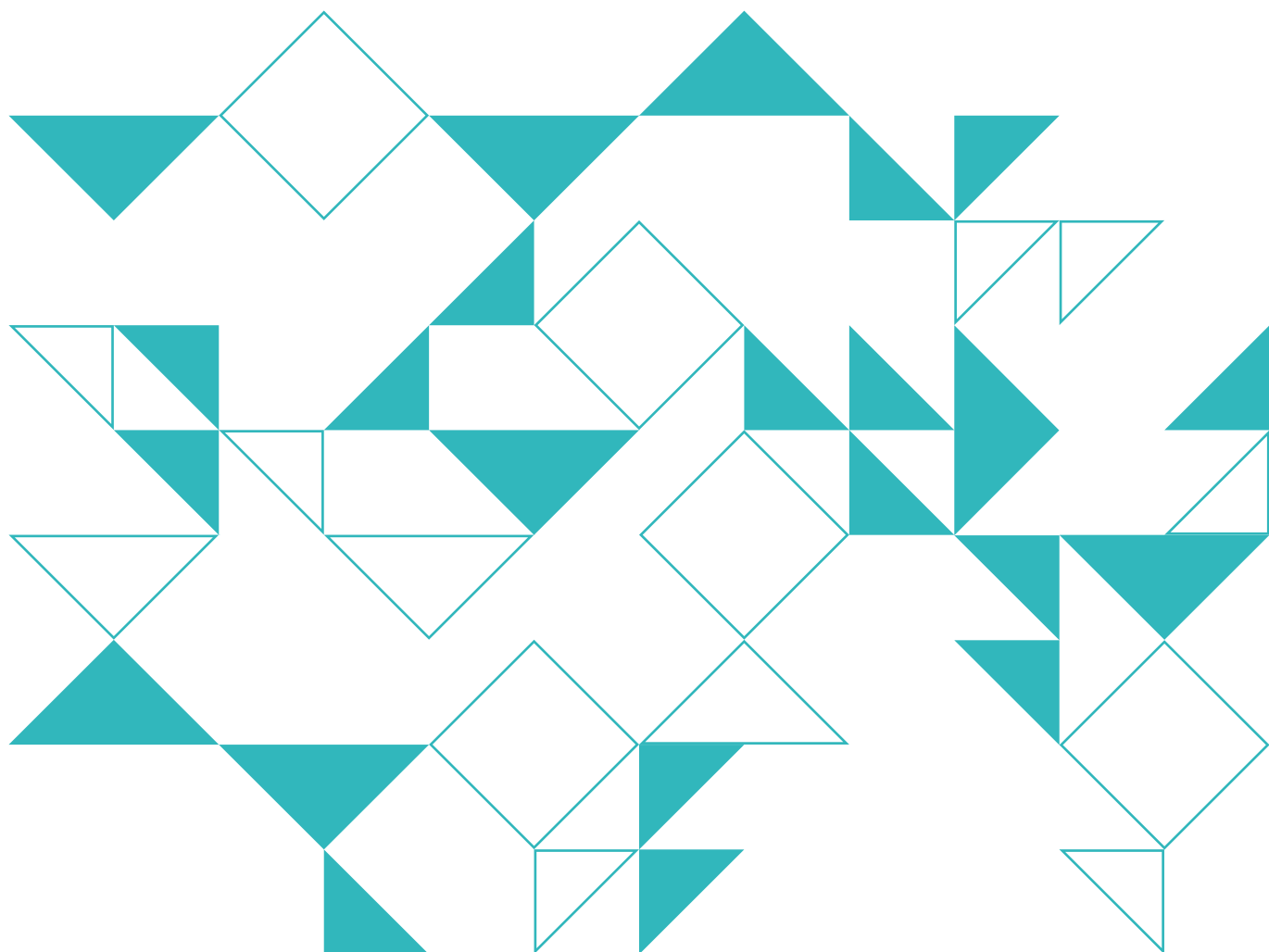
Smith LP. The Spectrum of Genetic Testing. Semin Oncol Nurs. 2019 Feb;35(1):11-21. doi: 10.1016/j.soncn.2018.12.008. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30660358.

Stiles, M. K. et al. (2021) '2020 APHRS/HRS expert consensus statement on the investigation of decedents with sudden unexplained death and patients with sudden cardiac arrest, and of their families', Heart Rhythm. Elsevier B.V., 18(1), pp. e1–e50. doi: 10.1016/j.hrthm.2020.10.010.

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 <https://www.breastcancer.org/genetic-testing/family-relationships>. Acessado em 28 de julho de 2022.

Zhao EY, Jones M, Jones SJM. Whole-Genome Sequencing in Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med 2019;9:a034579. https://medicine.uiowa.edu/humangenetics/sites/medicine.uiowa.edu/humangenetics/files/wysiwyg_uploads/IHMG_Testing_Proof3%20FINAL%202018.pdf





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

/bporgbr
bp.org.br