

Análise de segregação de variantes de significado incerto em indivíduos com anomalias congênitas múltiplas e (ou) deficiência intelectual

Palavras-Chave: Variantes de significado incerto, Anomalias congênitas múltiplas, Análise de segregação

Beatriz Schincariol Manhe, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Samira Spinati Silva, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Társis Antônio Paiva Vieira, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

INTRODUÇÃO:

O genoma humano apresenta variantes estruturais e de sequência que podem ser consideradas benignas ou patogênicas, incluindo variações no número de cópias (CNVs) e variantes de nucleotídeo único (SNVs) que podem implicar em distúrbios como Anomalias Congênitas Múltiplas (ACM) e/ou Deficiência Intelectual (DI) (*Beckmann et al. 2007*). Para a detecção de CNVs, a análise cromossômica por microarray (CMA) é a mais utilizada (*Miller et al. 2010*). O Sequenciamento do Exoma (WES), por outro lado, tem se mostrado importante para diagnóstico etiológico de pessoas com ACM e (ou) DI (*Sawyer et al. 2016*) (*Vetro et al 2018*). A interpretação das CNVs e SNVs identificadas por esses métodos pode ser complexa. Quando essas não constam em bancos de dados da população geral e também não têm relação aparente com fenótipos clínicos similares, não podem ser classificadas como benignas ou patogênicas, e são chamadas de variantes de significado incerto (VUS). Nesse contexto, o estudo de genitores permite uma interpretação mais completa das VUS e possibilita determinar se são herdadas ou *de novo*, facilitando a reclassificação das mesmas, aumentando as chances de determinar se existe relação causal entre a variante e o fenótipo em pessoas com ACM e/ou DI (*Rosenberg et al 2006*). Este estudo teve como objetivo analisar variantes de sequência classificadas como VUS em indivíduos com ACM e/ou DI e seus genitores.

METODOLOGIA:

A) Casuística

A casuística foi constituída por seis pacientes com CNVs e variantes de sequência classificadas como VUS, previamente detectadas, respectivamente por CMA e sequenciamento do exoma. Cinco pacientes apresentaram apenas uma variante de sequência classificada como VUS e um paciente apresentou duas (Tabela 1).

Tabela 1. Variantes de sequência classificadas como VUS encontradas nos seis pacientes.

Paciente	Principais sinais clínicos	Variantes de sequência	Tipo de mutação	Padrão de herança
P1	Displasia frontonasal; deficiência intelectual; criptorquidismo.	<i>GNAS</i> Chr20(GRCh37):g.57428393C>T	<i>Stop codon</i> (heterozigose)	AD
P2	ADNPM; microcefalia; baixa estatura; fenda labial; epilepsia.	<i>SOX11</i> Chr2(GRCh37):g.5833104G>A	<i>Missense</i> (heterozigose)	AD
		<i>NSDHL</i> ChrX(GRCh37):g.152034445C>T	<i>Missense</i> (heterozigose)	XL
P3	ADNPM, distúrbio de comportamento; macrocefalia	<i>ARID2</i> Chr12(GRCh37):g.46231454G>T	<i>Missense</i> (heterozigose)	AD
P4	Deficiência intelectual; dismorfismos	<i>ASXL2</i> Chr2(GRCh37):g.25965529_25965533del	<i>Frameshift</i> (heterozigose)	AD
P5	Cardiopatía congênita; fenda de palate; hipomímia facial; cúbito valgo; pés valgos	<i>TGFBR1</i> Chr9(GRCh37):g.101907053A>G	<i>Missense</i> (heterozigose)	AD
P6	ADNPM; dismorfismos	<i>INTS1</i> Chr7(GRCh37):g.1520518C>T	<i>Missense</i> (homozigose)	AR

ADNPM: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; AD: autossômico dominante; XL: ligada ao X; AR: autossômico recessivo.

B) Investigação

Para validar as variantes encontradas por sequenciamento do exoma nos pacientes, e posteriormente investigá-las nos genitores por sequenciamento de Sanger, as sequências foram amplificadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para tal, foram desenhados sete pares de primers.

1) Desenho de primers

Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e o banco de dados *Ensemble Genome Browser* foi utilizado para a obtenção das sequências alvo no genoma de referência (GRCh37) https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index. Os parâmetros considerados para o desenho dos primers foram o tamanho (entre 18 e 24 pares de bases), temperatura de *melting* (entre 58°C e 62°C), porcentagem de Guaninas e Citosinas (entre 30% e 80%), presença de repetições (evitando repetições de quatro ou mais pares de base iguais em sequência) e a base nitrogenada na extremidade 3' dos pares (que preferencialmente deveria ser Guanina ou Citosina). Os primers foram desenhados preferencialmente de maneira a evitar regiões polimórficas do genoma.

2) Padronização das PCR

A padronização das PCRs foi feita utilizando um DNA controle. O primeiro teste consistiu na realização de um gradiente de 8 temperaturas diferentes (55°C a 62°C) para determinar a temperatura ótima de amplificação. As temperaturas nas quais a PCR teve melhor desempenho foram selecionadas para as análises definitivas. Para alguns genes, o gel de agarose revelou a amplificação de fragmentos inespecíficos em todas as temperaturas do gradiente (Figura 1). Nos casos em que isso aconteceu, a PCR foi refeita, empregando dessa vez um protocolo de PCR *touchdown*. Essa técnica teve como objetivo aumentar a especificidade do primer, garantindo que se ligue ao segmento alvo, e evitar a amplificação dos fragmentos não desejados. Baseado no protocolo de *Green e Sambrook*, a temperatura de anelamento ajustada no termociclador deve corresponder a uma temperatura 5°C–10°C mais alta que a Temperatura de Melting (T_m) calculada para o primer em questão. Nessas condições, o anelamento do primer com o segmento

alvo é favorecido nos ciclos iniciais. Nos ciclos subsequentes, quando a sequência alvo já sofreu vários ciclos de amplificação e se tornou o produto predominante da PCR, a temperatura de anelamento é gradualmente reduzida para 2°C–5°C abaixo da T_m calculada.

3) PCR dos trios

Após as devidas padronizações, o material genético dos pacientes e genitores foi diluído a uma concentração de 60 ng/μL e então foram realizadas PCRs dos trios (paciente, pai e mãe) de acordo com protocolo previamente padronizado. Ao final da PCR, uma eletroforese em gel de agarose foi realizada para cada gene, a fim de confirmar a presença e integridade do material genético dos trios (Figura 2).

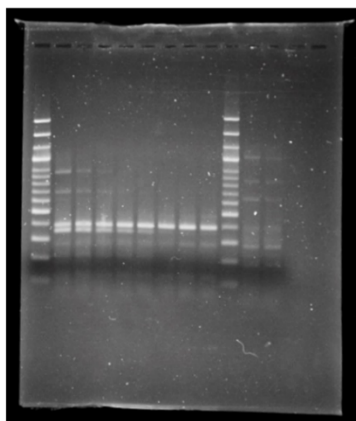


Figura 1: Gel com gradiente de temperatura e fragmentos inespecíficos antes da PCR touchdown

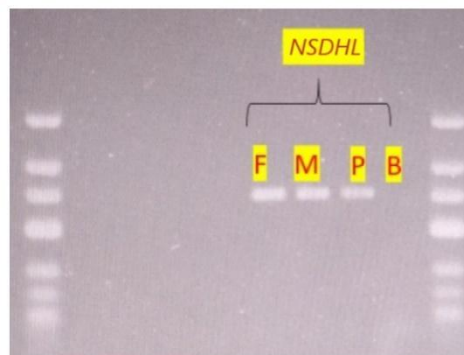


Figura 2: Gel de Agarose mostrando o resultado da amplificação do material genético dos pacientes e genitores pela PCR para o gene NSDHL. (Legenda: F = filho, M = mãe, P = pai e B = branco)

4) Sequenciamento de Sanger

Após a amplificação da sequência de interesse por PCR, cada uma das amostras dos pacientes e genitores foi sequenciada. Os produtos da PCR foram purificados para eliminar os reagentes e os nucleotídeos não incorporados. Em seguida, os produtos da PCR purificados foram ressuspensos com 10μl de formamida Hi-Di e colocados por 5 minutos no termociclador a 95°C. A reação de sequenciamento incluiu Big Dye, sequencing buffer 5 X - big dye termination, produtos da PCR, primer e H₂O. Logo após, foram inseridos no sequenciador automático de eletroforese capilar ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). A análise dos resultados do sequenciamento de Sanger foi realizada através do software *CodonCode Aligner* (<https://www.codoncode.com/aligner/download.htm>)

5) Análise das variantes

Após o sequenciamento dos pacientes e seus genitores, as variantes foram classificadas como herdada ou *de novo*. A partir dessa informação e da presença dessas variantes em bancos de dados da população geral ou em bancos de dados clínicos, verificados através da plataforma VarStation (<https://varstation.com/pt/>), foi possível realizar uma análise preliminar de predição de patogenicidade das variantes e a reclassificação de algumas delas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As figuras 3, 4, 5 e 6 mostram, de cima para baixo, três gráficos em cada figura com os resultados do sequenciamento de Sanger do paciente, mãe e pai. Os gráficos contêm picos com quatro cores diferentes, correspondentes às quatro bases nitrogenadas (A,T,C e G). A linha vertical indica a base nitrogenada em que está localizada a variante encontrada. A presença de um único pico sinalizado pela linha vertical indica homozigose/ hemizigose (para genes no

cromossomo X em homens), enquanto a presença de dois picos sobrepostos significa que aquela base em questão está em heterozigose.

Para o Paciente 1, foi confirmada a variante de sequência no gene *GNAS* em heterozigose. Ao analisar as amostras dos pais, foi possível notar que a mãe é homozigota para o alelo normal, sem a variante, enquanto o pai apresentou a mesma alteração que o filho, também em heterozigose. A variante, portanto, é herdada do pai (Figura 3). Essa variante não pôde ser reclassificada e investigações adicionais são necessárias, pois o gene *GNAS* está localizado em uma região de *imprinting* no cromossomo 20 e há relatos na literatura de variantes patogênicas herdadas do pai (Tabela 2).

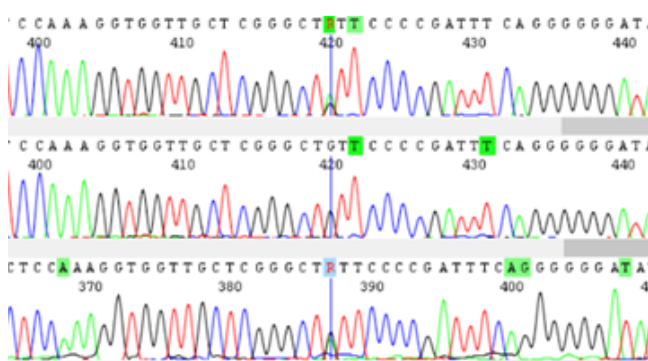


Figura 3: Sequenciamento de Sanger do Paciente 1 (Gene *GNAS*)

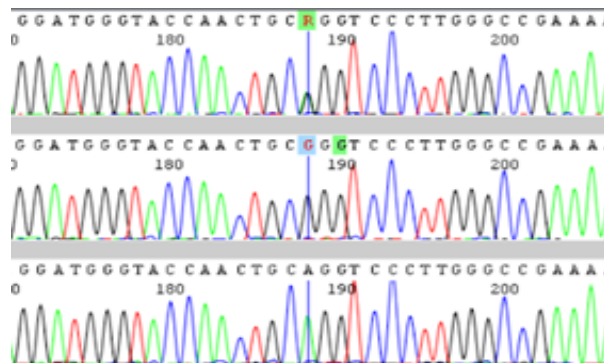


Figura 4: Sequenciamento de Sanger do Paciente 2 (Gene *NSDHL*)

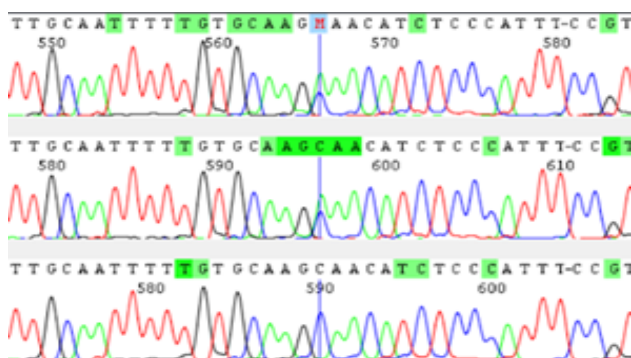


Figura 5: Sequenciamento de Sanger do Paciente 3 (Gene *ARID2*)

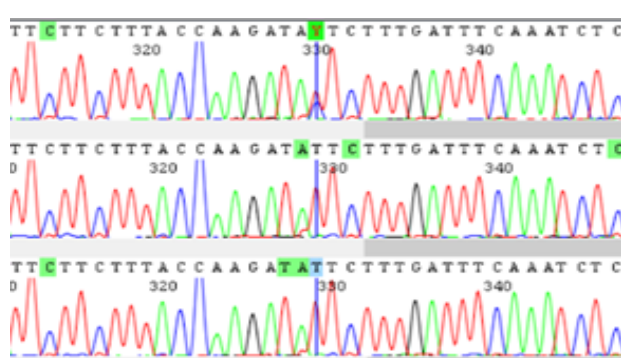


Figura 6: Sequenciamento de Sanger do Paciente 5 (Gene *TGFBR1*)

A variante no gene *NSDHL*, localizado no cromossomo X, foi confirmada para o Paciente 2, do sexo feminino, em heterozigose. A mesma variante aparece em homozigose no seu pai. A mãe é homozigota para o alelo selvagem. A variante, portanto, é de herança paterna (Figura 4). Variantes patogênicas nesse gene são relatadas tanto em meninos, em uma forma ligada ao X recessiva, como em meninas, em uma forma ligada ao X dominante. Como a variante dessa paciente foi herdada de seu pai fenotipicamente normal, essa foi reclassificada como provavelmente benigna (Tabela 2).

A variante do Paciente 3, no gene *ARID2*, foi confirmada e também encontrada em heterozigose na mãe, portadora da variante. O pai é homozigoto para o alelo mais comumente encontrado na população, portanto um caso de herança materna confirmada (Figura 5). Como variantes patogênicas nesse gene causam a Síndrome de Coffin-Siris 6, com herança dominante, e a mãe é fenotipicamente normal, essa variante foi reclassificada como provavelmente benigna (Tabela 2).

Para o paciente 5, a variante de sequência no gene *TGFBR1* foi confirmada em heterozigose. A variante não foi encontrada em nenhum dos genitores, sendo ambos homozigotos para o alelo selvagem. A variante foi, portanto, classificada como *de novo* (Figura 6). A análise *in silico* da variante na plataforma VarStation revelou que ela é provavelmente deletéria. Uma revisão na literatura mostrou a ocorrência de outras variantes no mesmo gene, em diferentes

pacientes, a maioria associada à síndrome de Loey-Dietz. Como se trata de uma variante *de novo* e há múltiplas análises *in silico* mostrando o potencial deletério dessa variante, ela foi reclassificada como provavelmente patogênica (Tabela 2). Porém, uma nova avaliação clínica será realizada, com novos exames que podem confirmar o diagnóstico da síndrome e, por consequência, resultar na reclassificação para patogênica.

No caso dos Pacientes 4 e 6, não foi possível realizar a análise de segregação das variantes, pois não foi possível obter amostras dos genitores neste período. Além disso, a variante no gene SOX11 do paciente 2 não pode ser avaliada, pois não se obteve sucesso na amplificação por PCR.

Tabela 2. Resumo dos achados de cada paciente confirmados por sequenciamento, incluindo o resultado da análise de segregação e a reclassificação das variantes.

Paciente	Gene	Análise de segregação	Reclassificação
P1	GNAS	Herdado do pai	VUS
P2	NSDHL SOX11	Herdado do pai Inconclusiva	Provavelmente benigna
P3	ARID2	Herdado da mãe	Provavelmente benigna
P4	ASXL2	Inconclusiva	-
P5	TGFBR1	<i>de novo</i>	Provavelmente patogênica
P6	INTS1	Inconclusiva	-

CONCLUSÕES:

Dentre os quatro pacientes que tiveram suas variantes sequenciadas e confirmadas, três possuem variantes herdadas de um dos genitores, enquanto somente um tem uma alteração do tipo *de novo* (Tabela 2). Entre as três variantes herdadas, duas foram reclassificadas como provavelmente benignas e um caso necessita de análise complementar, pois mesmo sendo herdada a variante pode estar relacionada ao fenótipo por este gene estar localizado em uma região de *imprinting*. Para o paciente portador da variante *de novo*, essa foi reclassificada como provavelmente patogênica. Assim, este estudo permitiu a reclassificação de variantes em 3/6 pacientes analisados e reforça a importância da análise de segregação de variantes encontradas pelo sequenciamento do exoma.

BIBLIOGRAFIA:

Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet* 2007;8(8):639-46.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010;86(5):749-64.

Sawyer SL, Hartley T, Dymont DA, Beaulieu CL, Schwartzentruber J, Smith A et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *ClinGenet*. 2016;89(3):275-84.

Vetro A, Godin D, Lesende I, Limongelli I, Ranzani GN, Novara F et al. Diagnostic application of a capture based NGS test for the concurrent detection of variants in sequence and copy number as well as LOH. *Clin Genet*. 2018;93(3):545-556.

Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepisch-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 2006;43(2):180-6.

Green, Michael R., and Joseph Sambrook. "Touchdown polymerase chain reaction (PCR)." *Cold Spring Harbor Protocols* 2018.5 (2018): pdb-prot095133.