

## Desenvolvimento de uma metodologia de sequenciamento alvo de RNA como ferramenta para aumentar o poder diagnóstico dos testes genéticos para síndromes de predisposição hereditária ao câncer

Souza, L.D<sup>1</sup>; Defelicibus, A<sup>1</sup>; Soares, D.C.Q<sup>1</sup>; Pereira, D.P<sup>1</sup>; Rocha, J.C.C<sup>1</sup>; Carraro, D.M<sup>1</sup>; Torrezan, G.T<sup>1</sup> – 1A.C Camargo Cancer Center

### Introdução

Painéis multigenes através do sequenciamento de nova geração (NGS) são utilizados para o diagnóstico genético de indivíduos em risco para síndromes de predisposição hereditária ao câncer. Uma significativa parcela dos testes genéticos apresentam resultados incertos, com a identificação de variantes de relevância clínica desconhecida (VUS). Estudos atuais demonstram que o sequenciamento alvo pareado de DNA e RNA é uma estratégia eficaz para auxiliar na reclassificação de VUS.

**Objetivos: desenvolver e validar uma metodologia para sequenciamento alvo de RNA com um painel de 26 genes de predisposição hereditária ao câncer; Avaliar a relevância do teste genético de RNA para a reclassificação de VUS intrônicas e exônicas.**

### Casuística e Métodos

O estudo se resume em dois principais momentos, Validação técnica e Validação clínica, conforme a figura 1:

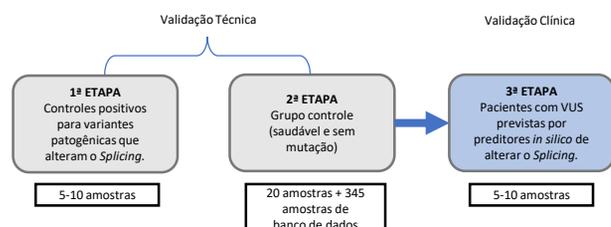


Figura 1 – Delineamento geral do Estudo

A Validação técnica visa a padronização da técnica com variantes patogênicas (P) ou provavelmente patogênicas (PP) já conhecidas de afetarem o *splicing*. A validação clínica que visa avaliar o poder da técnica de RNAcap em reclassificar VUS previstas por softwares de predição (MaxEntScan, dbcsSNV e SpliceAI) de afetar o padrão de *splicing*. Os pacientes serão selecionados através da revisão das variantes identificadas em projetos de pesquisa prévios, em laudos do Laboratório de diagnóstico do A.C Camargo e do Departamento de Oncogenética, utilizando filtros do software VarSeq (Figura 2).

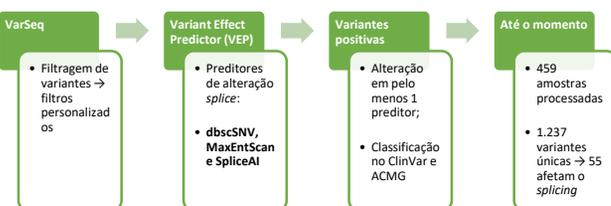


Figura 2 – Filtragem e seleção de variantes germinativas

A partir do RNA de leucócitos ou tecido normal, a técnica de RNA-Cap será realizada através de síntese de cDNA dupla-fita, captura com sondas de DNA para as regiões exônicas de 26 genes e sequenciamento na plataforma Illumina NextSeq 500.

### Resultados

Até o momento, realizamos a revisão, seleção e avaliação *in silico* de efeito em *splicing* para variantes germinativas detectadas em 459 pacientes que fizeram testes genéticos com painéis contendo de 26 a 126 genes, dos quais 414 (90,2%) apresentaram pelo menos uma variante rara selecionada, correspondendo a 1.237 variantes únicas. Pela avaliação dos preditores *in silico*, 55 (4,4%) variantes únicas foram consideradas como potencialmente de impacto no splice em pelo menos 1 preditor. Para o estudo dos 26 genes de predisposição foram identificados 11 pacientes com 8 variantes únicas P/PP com efeito em splice, e 10 pacientes com 9 variantes únicas VUS (gráfico 1 e tabela 1). Realizamos o sequenciamento de RNA-cap em 12 amostras (4 com variantes P/PP, 4 com VUS e 4 controles), e os dados gerados ainda estão em análise.

Gráfico 1 – Genes mutados e a localização das suas variantes no DNA

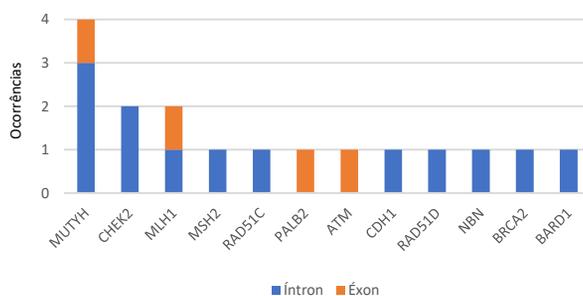


Tabela 1 – Variantes únicas previstas de afetarem o *splicing* nos 26 genes de estudo

Gene	HGVS c.	ACMG	Pac.	Preditores de Splicing						Pred_DS_AL	Pred_DS_DL
				Ada Score	Rf Score	Alt.	Ref.	Dif.	SpliceAI		
MUTYH	c.1187G>A	P	5	0.99	0.79	10,56	10,79	0,23	0,00	0,00	
MSH2	c.942+3A>T	P	1	0.99	0.98	2,54	8,59	6,06	0,00	0,49	
RAD51C	c.905-2_905-1delAG	P	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0,91	0,00	
MLH1	c.677G>A	P	1	0.99	1,0	5,00	9,22	4,22	0,00	0,44	
MLH1	c.116+5G>C	P	1	0.99	0,98	4,81	8,60	3,79	0,00	0,74	
MUTYH	c.933+3A>C	P	1	0.99	0,87	-4,51	6,31	10,82	0,00	0,22	
CHEK2	c.846+4_846+7del	LP	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,98	
PALB2	CNV dup exon 11	LP	1	na	na	na	na	na	na	na	
ATM	c.6975G>A	VUS	1	0.99	0,98	-2,89	4,02	6,90	0,00	0,85	
MUTYH	c.934-2A>G	VUS	2	0.99	0,78	-0,48	7,48	7,96	0,95	0,00	
CHEK2	c.320-5T>A	VUS	2	0,90	0,72	5,95	7,66	1,71	0,01	0,00	
CDH1	c.833-3C>G	VUS	1	0.99	0,89	1,37	8,10	6,73	0,55	0,00	
MUTYH	c.1518+3A>T	VUS	1	0,22	0,45	7,07	11,01	3,95	0,00	0,85	
RAD51D	c.481-8C>T	VUS	1	2,41E+10	0,00	8,54	8,21	-0,33	0,97	0,00	
NBN	c.2071-4A>G	VUS	1	0.99	0,94	5,17	8,86	3,68	0,00	0,00	
BRCA2	c.8755-11A>G	VUS	1	0.99	0,92	-0,88	3,78	4,66	0,92	0,00	
BARD1	c.1569-3C>G	VUS	1	0.99	0,75	-8,89	5,42	14,30	(-)	(-)	

HGVS c.: Nomenclatura de variantes segundo o *Human Genome Variation Society*; ACMG: classificação de variantes segundo os critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG); na: Não se aplica; Pac: quantidade de pacientes com a variante; P: Patogênica; LP: Likely pathogenic; VUS: Variant of uncertain significance; Em vermelho a pontuação que atingiu o ponto de corte do respectivo preditor.

### Conclusões

Estabelecemos o fluxo e critérios para seleção de variantes e pacientes para o estudo e identificamos 21 pacientes para as etapas de validação técnica e clínica. Iremos avaliar os resultados de painéis genéticos de mais 500 pacientes para identificarmos os demais pacientes do estudo.

### Contato

larissa.dias@accamargo.org.br  
giovana.torrezan@accamargo.org.br