

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO MASSIVO PARALELO PARA
DETECÇÃO DE VARIANTES NO GENE *SMN1* CAUSADORAS DA ATROFIA
MUSCULAR ESPINHAL**

CAROLINA SERPA BRASIL

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO MASSIVO PARALELO PARA
DETECÇÃO DE VARIANTES NO GENE *SMN1* CAUSADORAS DA ATROFIA
MUSCULAR ESPINHAL**

CAROLINA SERPA BRASIL

Orientador: Prof. Dr. Jonas Alex Morales Saute

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção de Mestre em Medicina: Ciências Médicas
ênfase em Genética Médica, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Brasil, Carolina Serpa
VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO MASSIVO
PARALELO PARA DETECÇÃO DE VARIANTES NO GENE SMN1
CAUSADORAS DA ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL / Carolina
Serpa Brasil. -- 2024.
68 f.
Orientador: Jonas Alex Morales Saute.

Coorientadora: Ana Carolina Brusius Facchin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Atrofia Muscular Espinhal. 2. AME. 3. Método
Diagnóstico. 4. Sequenciamento Massivo Paralelo. 5.
Triagem Neonatal. I. Saute, Jonas Alex Morales,
orient. II. Facchin, Ana Carolina Brusius, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Aprovado em: 02/05/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Machado de Castilhos

PPGCM - UFRGS

Prof.^a Dr.^a Clevia Rosset

PPGCM - UFRGS

Prof. Dr. Tiago Finger Andreis

HOSPITAL MOINHOS DE VENTO

Prof.^a Dr.^a Fernanda Sales Luiz Vianna

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Prof. Dr. Jonas Alex Morales Saute

PPGCM - UFRGS (Orientador)

Epígrafe:

“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para a humanidade!”

Louis Pasteur

RESUMO

Introdução: A atrofia muscular espinhal (AME) é caracterizada por fraqueza muscular progressiva decorrente da degeneração dos motoneurônios do corno anterior da medula espinhal, sendo a segunda doença autossômica recessiva fatal mais comum. Pela possibilidade de ser classificada em tipos, o diagnóstico de AME precisa ser uma avaliação dos sinais clínicos associados à análise molecular. A técnica molecular usualmente utilizada para detecção da variante patogênica comum no gene *SMN1* é o *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Entretanto esta técnica não apresenta um bom custo benefício, devido ao tempo despendido para execução quando utilizada em larga escala em populações de baixo risco. Outros grupos de pesquisa já estão pesquisando sobre a técnica de sequenciamento massivo paralelo (SMP) como uma metodologia de triagem, pois além de identificar doentes e portadores, esta técnica permite a inclusão de outros genes no mesmo ensaio, sendo promissora no contexto de triagem molecular de doenças genéticas e na busca por modificadores moleculares de fenótipo da doença. **Objetivo:** Validar o SMP para identificação de variantes patogênicas no *SMN1*, tanto grandes deleções quanto variações de nucleotídeos únicos e pequenas inserções. **Métodos:** Realização de estudo de acurácia diagnóstica do SMP de painel contendo os genes *SMN1* e *SMN2* e os genes controle (potencialmente modificadores do fenótipo) *NCALD* e *PLS3* pela plataforma Ion Torrent (S5), em pacientes com genótipo previamente definido por MLPA, divididos entre os grupos homocigotos para deleção comum no *SMN1*, portadores (heterocigotos) e homocigotos normais. **Resultados:** O estudo de acurácia foi realizado em 49 das 50 amostras (8 homocigotos para deleção comum, 20 heterocigotos e 21 homocigotos normais). A discriminação entre casos com AME (zero cópias de *SMN1*), e não afetados, portadores (1 cópia *SMN1*) e controles (2 cópias *SMN1*) foi possível através da normalização de profundidade de leituras com gene controle *NCALD*. A acurácia (área sob a curva, AUC) para diferenciação entre casos e portadores foi de 1.0 (IC95% 1.0 a 1.0, $p < 0.001$), para diferenciação entre casos e controles foi de 1.0 (IC95% 1.0 a 1.0, $p < 0.001$) e para a diferenciação entre portadores e controles foi de 0.864 (IC95% 0.74 a 0.989, $p < 0.001$). A acurácia para quantificação do número de cópias do gene *SMN2* não foi estatisticamente significativa, exceto na diferenciação de sujeitos com 0 e 4 cópias do *SMN2* em relação àqueles com 1, 2 ou 3 cópias deste gene. O painel também foi capaz de identificar a variante

p.Gln154* no *SMN1/SMN2* em dois nos pacientes com heterozigose composta e a variante modificadora c.859G>C no *SMN2* foi coberta pelo painel. **Conclusão:** O painel de SMP contendo amplicons específicos do *SMN1* e *SMN2* e apenas utilizando 1 gene normalizador foi capaz de diferenciar com acurácia de 100% indivíduos homozigotos para a deleção comum do *SMN1* (afetados), de indivíduos portadores e controles. A acurácia para diferenciação entre portadores e controles bem como para quantificação do número de cópias do *SMN2* não foi considerada adequada. Desta forma, o estudo realizou a validação de um painel de SMP como exame de triagem diagnóstica para AME com custo muito inferior aos testes com SMP disponíveis atualmente (que utilizam centenas de genes controles) que poderá ser uma ferramenta de menor custo útil no contexto de programas de triagem neonatal. Entretanto este teste não parece ser adequado como exame de confirmação diagnóstica por não diferenciar satisfatoriamente casos e portadores.

Palavras chave: Atrofia Muscular Espinhal, AME, Método Diagnóstico, Sequenciamento Massivo Paralelo, Triagem Neonatal.

ABSTRACT

Introduction: Spinal Muscular Atrophy (SMA) is characterized by progressive muscle weakness due to the degeneration of motor neurons in the anterior horn of the spinal cord. It is the second most common fatal autosomal recessive disease. Due to the possibility of being classified into types, the diagnosis of SMA requires an evaluation of clinical signs associated with molecular analysis. The molecular technique usually used for detecting the common pathogenic variant in the *SMN1* gene is Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). However, this technique does not present good cost-effectiveness due to the time required for execution when used on a large scale in low-risk populations. Other research groups are already investigating the technique of massive parallel sequencing (MPS) as a screening methodology because, in addition to identifying patients and carriers, this technique allows for the inclusion of other genes in the same assay. This is promising in the context of molecular screening for genetic diseases and in the search for molecular modifiers of the disease phenotype. **Objective:** To validate MPS for the identification of pathogenic variants in *SMN1*, including large deletions, single nucleotide variations, and small insertions. **Methods:** A diagnostic accuracy study of the MPS panel containing the *SMN1* and *SMN2* genes and the control genes (potential phenotype modifiers) *NCALD* and *PLS3* was conducted using the Ion Torrent (S5) platform in patients with previously defined genotypes by MLPA. These patients were divided into groups of homozygotes for the common deletion in *SMN1*, carriers (heterozygotes), and normal homozygotes. **Results:** The accuracy study was conducted on 49 out of 50 samples (8 homozygotes for the common deletion, 20 heterozygotes, and 21 normal homozygotes). Discrimination between SMA cases (zero copies of *SMN1*), unaffected individuals, carriers (1 copy of *SMN1*), and controls (2 copies of *SMN1*) was possible through the normalization of read depth with the control gene *NCALD*. The accuracy (area under the curve, AUC) for differentiating between cases and carriers was 1.0 (95% CI 1.0 to 1.0, $p < 0.001$), for differentiating between cases and controls was 1.0 (95% CI 1.0 to 1.0, $p < 0.001$), and for differentiating between carriers and controls was 0.864 (95% CI 0.74 to 0.989, $p < 0.001$). The accuracy for quantifying the number of copies of the *SMN2* gene was not statistically significant, except in the differentiation of subjects with 0 and 4 copies of *SMN2* compared to those with 1, 2, or 3 copies of this gene. The panel was also able to identify the p.Gln154 variant in *SMN1/SMN2* in two patients with compound heterozygosity,

and the modifying variant c.859G>C in *SMN2* was covered by the panel. **Conclusion:** The MPS panel containing specific amplicons of *SMN1* and *SMN2* and using only one normalizing gene was able to accurately differentiate 100% of homozygous individuals for the common *SMN1* deletion (affected) from carriers and controls. The accuracy for differentiating between carriers and controls, as well as for quantifying the number of copies of *SMN2*, was not considered adequate. Thus, the study validated an MPS panel as a diagnostic screening test for SMA with a much lower cost compared to currently available MPS tests (which use hundreds of control genes), which could be a useful low-cost tool in the context of neonatal screening programs. However, this test does not seem to be adequate as a confirmatory diagnostic test because it does not satisfactorily differentiate cases and carriers.

Key Words: Spinal Muscular Atrophy, SMA, Diagnostic Method, Massive Parallel Sequencing, Neonatal Screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de seleção dos estudos para elaboração do projeto.

Figura 2 – Estrutura do gene *SMN* no cromossomo 5.

Figura 3 – Plataforma de sequenciamento MiSeq.

Figura 4 – Sistema Ion GeneStudio S5 com o Sistema Ion Chef.

Figura 5 – Chip Ion 510™.

Figura 6 – Marco Conceitual.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação clínica e correlação com o número de cópias do gene *SMN2*.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tipos clínicos e número de cópias *SMN2*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AME: Atrofia muscular espinhal

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MPS: Massive Parallel Sequence

NGS: Next Generation Sequence

SCA: Ataxias Espinocerebelares

SMA: Spinal Muscular Atrophy

SMP: Sequenciamento Massivo Paralelo

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DHPLC: Cromatografia líquida desnaturante de alta eficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	17
2.2. Definindo o problema.....	18
2.3. Aspectos Gerais Doença de Atrofia muscular espinhal.....	19
2.3.1 Aspectos Clínicos.....	20
2.3.2 Aspectos genéticos.....	20
2.4 Diagnóstico.....	22
2.5 Diagnóstico Molecular.....	23
2.6 Epidemiologia.....	25
2.7 Fisiopatologia.....	25
2.8 Progressão e Tratamento.....	26
2.9 Sequenciamento Massivo Paralelo.....	27
2.9.1 Illumina.....	28
2.9.2 Ion Torrent.....	29
2.10 SMP para o diagnóstico de AME.....	31
3. MARCO CONCEITUAL.....	34
4. JUSTIFICATIVA.....	35
5. OBJETIVOS.....	37
5.1 Objetivo Geral.....	37
5.2 Objetivos Específicos.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
7. ARTIGO.....	43
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
9. PERSPECTIVAS.....	67
10. ANEXOS E/OU APÊNDICES.....	68

1. INTRODUÇÃO

A Atrofia muscular espinhal (AME), é uma doença autossômica recessiva que pode acometer desde recém nascidos até adultos (D'Amico *et al.* 2011). Caracterizada pela degeneração dos neurônios motores da medula espinhal, a AME ocasiona progressiva perda de força e atrofia muscular (Verhaart *et al.*, 2017; Kolb *et al.*, 2015). Apesar de ser uma condição rara, é a causa mais frequente de óbito infantil decorrente de uma condição monogênica e é a segunda doença autossômica recessiva fatal mais comum (D'Amico *et al.*, 2011). Sua incidência é estimada em 1 em 6.000 a 1 em 10.000 nascidos vivos, sendo a frequência de portadores das variantes patogênicas estimada em 1 em cada 54 habitantes (Mercuri; Bertini; Iannaccone, 2012; Oliveira Netto *et al.*, 2023).

A AME é causada por variantes patogênicas bi-alélicas no gene sobrevivência do neurônio motor (*SMN1*), localizada na região do cromossomo 5q, sendo que em cerca de 95% dos casos há deleção dos éxons 7 e 8 deste gene em homozigose e no restante dos casos a deleção comum em heterozigose é acompanhada por variante patogênica de ponto no outro alelo (Mercuri *et al.*, 2018). Em seres humanos, existem duas formas do gene sobrevivência do neurônio motor em cada alelo: a forma telomérica (*SMN1*) e a forma centromérica (*SMN2*). O *SMN2* difere fundamentalmente do *SMN1* por um único nucleotídeo, resultando na maioria dos transcritos em exclusão do éxon 7 do RNA mensageiro maduro, que ocasiona a formação de uma proteína SMN instável, pouco funcional e rapidamente degradada (D'Amico *et al.* 2011).

A perda de função do *SMN1* é a causa da doença, mas será a quantidade de proteína SMN produzida a partir do *SMN2* que determinará sua gravidade, havendo uma relação inversa entre a gravidade e o número de cópias de *SMN2*. A AME é dividida classicamente em 4 fenótipos após o período gestacional, sendo o tipo I o mais grave e o tipo IV a forma de início na vida adulta (Mercuri *et al.*, 2018; Zanuteli *et al.*, 2024).

Nos últimos anos, avanços extraordinários possibilitaram o surgimento de terapias modificadoras de doença. Atualmente, há três terapias aprovadas, inclusive em território nacional, aprovadas pela ANVISA, para o tratamento da AME. Em 2016, o órgão regulatório americano, FDA (Food and Drug Administration), aprovou a Nusinersena (Spiranza), um oligonucleotídeo antisense (ASO) de uso intratecal (Goodkey *et al.*, 2018). Dois anos após, em

2018, o Onasemnogene abeparvovec (Zolgensma) (Rao *et al*, 2018; Hoy SM, 2019) uma terapia de substituição gênica de uso endovenoso em dose única e, mais recentemente, em agosto de 2020, um tratamento oral para a AME, uma pequena molécula com mecanismo similar à nusinersena, o Risdiplam (Evrysdi) (Dhillon S, 2020), foram aprovados para uso. O advento de terapias que modificam significativamente o curso da doença, associados às evidências de maior eficácia destas terapias nos estudos em fase pré-sintomática da condição, corroboram em favor do início precoce do tratamento. Devido a isso, diversos países incluíram a testagem para AME em seus programas de triagem neonatal. No Brasil, a LEI Nº 14.154, DE 26 DE MAIO DE 2021 incluiu a triagem para AME como parte do programa de expansão da triagem neonatal, sendo um processo em implementação, não concluído, e em que será importante a disponibilidade de testes de triagem com elevada sensibilidade e especificidade e baixo custo.

Grande parte dos testes de triagem no contexto da AME analisam apenas a ausência ou presença do gene *SMN1* e, quando observada a ausência, sugere-se realização de testes confirmatórios como o Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) ou PCR quantitativo (qPCR), capazes de quantificar o número de cópias de *SMN1* e *SMN2*. Estudos recentes apontam que o Sequenciamento Massivo Paralelo (SMP) também poderia ser utilizado como teste confirmatório (Feng *et al*, 2017; Mercuri *et al*, 2018), sendo possível analisar simultaneamente a presença de variantes de ponto no *SMN1*.

Considerando esta potencial vantagem do SMP de detectar simultaneamente variantes de ponto e considerando que a alta probabilidade de que nos próximos anos sejam descritos tratamentos eficazes que motivem a inclusão de novas condições nos programas de triagem neonatal que necessitem de testagem molecular, é importante que mais estudos sejam realizados para confirmar a validade do SMP para o diagnóstico de AME.

Desta forma nosso objetivo foi validar um painel com apenas 4 genes para avaliar o número de cópias de *SMN1* e *SMN2* e variantes de ponto, normalizando o análise do número de cópias através de genes controle (*PLS3* e *NCALD*), escolhidos por serem genes potencialmente modificadores do fenótipo da doença, na busca de um teste de SMP de menor custo, eventualmente passível de uso em contexto de triagem neonatal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Realizamos revisão da literatura até março de 2024, de estudos que utilizaram o Sequenciamento Massivo Paralelo para realizar o diagnóstico de AME com avaliação de número de cópias de *SMN1* e *SMN2*. Para esta busca de estudos foram consultadas as bases de dados PubMed, EMBASE e LILACS utilizando os termos “spinal muscular atrophy”, “molecular diagnostic”, “next generation sequencing” conforme o acrônimo PECO, sem restrições de data ou idioma. Ver **Figura 1**.

A busca detalhada realizada na base de dados PubMed foi: ("muscular atrophy, spinal"[MeSH Terms] OR ("muscular"[All Fields] AND "atrophy"[All Fields] AND "spinal"[All Fields]) OR "spinal muscular atrophy"[All Fields] OR ("spinal"[All Fields] AND "muscular"[All Fields] AND "atrophy"[All Fields])) AND *SMN1*[All Fields] AND *SMN2*[All Fields] AND "sma"[All Fields] AND ("pathology, molecular"[MeSH Terms] OR ("pathology"[All Fields] AND "molecular"[All Fields]) OR "molecular pathology"[All Fields] OR ("molecular"[All Fields] AND "diagnostic"[All Fields]) OR "molecular diagnostic"[All Fields]) AND copy[All Fields] AND number[All Fields] AND NGS[All Fields] AND ("high-throughput nucleotide sequencing"[MeSH Terms] OR ("high-throughput"[All Fields] AND "nucleotide"[All Fields] AND "sequencing"[All Fields]) OR "high-throughput nucleotide sequencing"[All Fields] OR ("next"[All Fields] AND "generation"[All Fields] AND "sequencing"[All Fields]) OR "next generation sequencing"[All Fields]) AND massive[All Fields] AND parallel[All Fields] AND ("high-throughput nucleotide sequencing"[MeSH Terms] OR ("high-throughput"[All Fields] AND "nucleotide"[All Fields] AND "sequencing"[All Fields]) OR "high-throughput nucleotide sequencing"[All Fields] OR ("sequencing"[All Fields] AND "high"[All Fields] AND "throughput"[All Fields] AND "nucleotide"[All Fields]) OR "sequencing, high throughput nucleotide"[All Fields]) AND ("sequence analysis"[MeSH Terms] OR ("sequence"[All Fields] AND "analysis"[All Fields]) OR "sequence analysis"[All Fields] OR "sequencing"[All Fields])

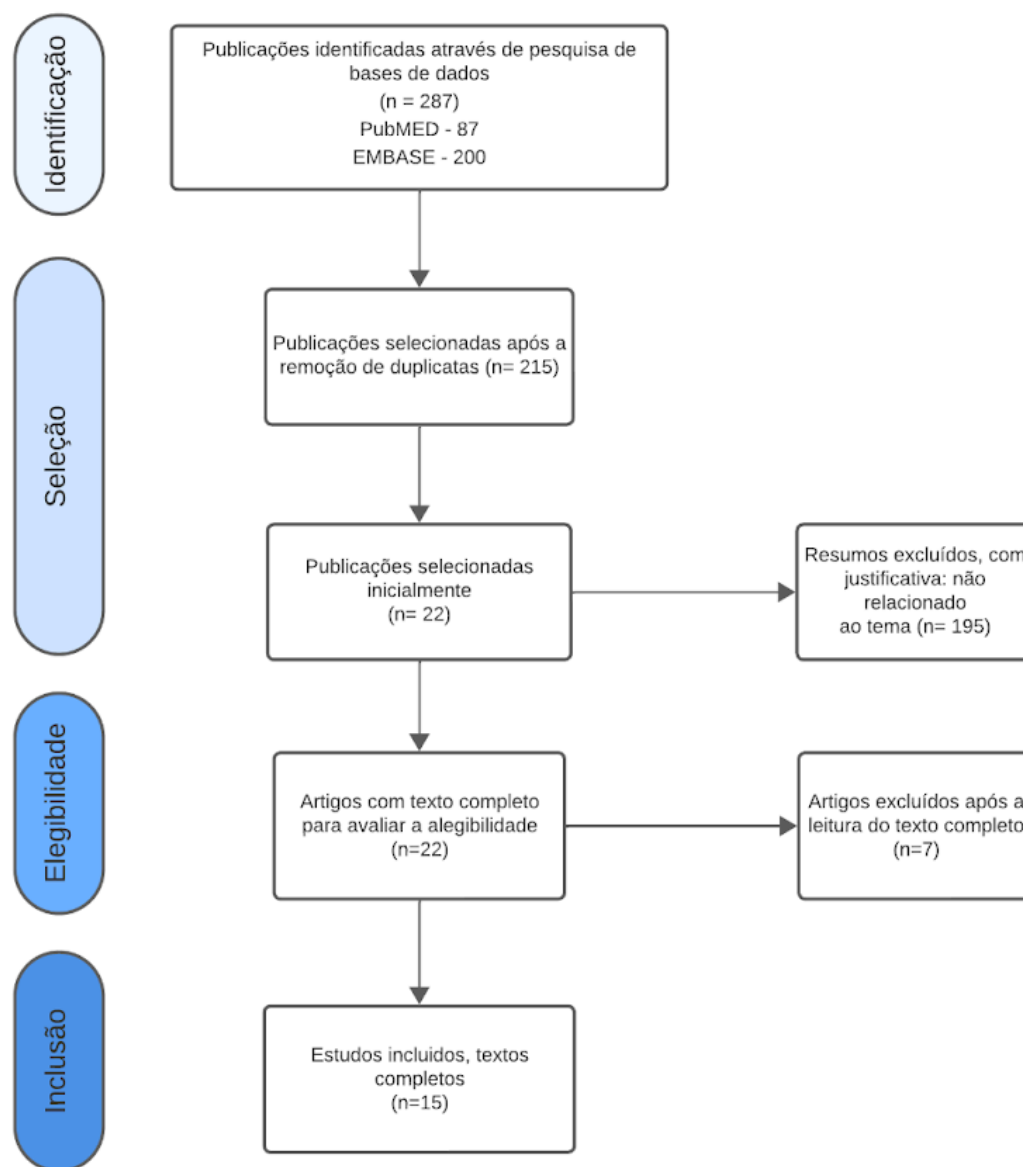


Figura 1 - Fluxograma de seleção dos estudos para elaboração do projeto.

2.2. Definindo o problema

A AME é uma doença em que os genes *SMN1* e *SMN2* são os principais causadores da doença, onde o número de cópias de *SMN1* dita quem é portador, doente ou saudável e o número de cópias *SMN2* auxilia a compreender sua gravidade. Com isso, temos hoje métodos diagnósticos capazes de nos fornecer essas informações, mas outras informações em torno de outras regiões de interesse como no caso de modificadores de fenótipo e mutações de ponto, o método de diagnóstico padrão ouro atual, o MLPA, não abrange.

2.3. Aspectos Gerais Doença de Atrofia muscular espinhal

A atrofia muscular espinhal está há mais de 130 anos sendo estudada e detalhada na literatura. Por apresentar sinais e sintomas desde os primeiros meses de vida, é uma doença que requer um diagnóstico preciso e rápido para retardar a sua progressão. Tendo uma incidência no Brasil de 1 para 10.000 nascidos vivos (Oliveira Netto *et al.*, 2023) a AME é considerada uma doença rara, porém seu diagnóstico e tratamento são muito difundidos e estudados, apresentando diversas intervenções disponíveis desde terapias gênicas a fisioterapias. Sendo a principal causa de AME a deleção do gene *SMN1*, e um dos principais marcadores de gravidade é o gene *SMN2*, parálogo ao *SMN1*, a AME se torna uma doença desafiadora também no quesito diagnóstico.

A AME é caracterizada pela degeneração dos neurônios motores na medula espinhal, essa degeneração é causada por variantes no gene do neurônio motor 1 de sobrevivência, *SMN1*. O *SMN1* é o gene responsável por produzir a proteína do neurônio motor de sobrevivência que está presente na medula espinhal, quando não há variante patogênica no gene, a proteína é expressa de maneira eficiente levando ao desenvolvimento de um indivíduo saudável, porém quando há a falta deste gene a proteína não é expressa da maneira que deveria.

O gene *SMN2* é um gene parálogo ao *SMN1*, tendo sido descrito na literatura por apresentar 11 bases nucleotídicas de diferença do *SMN1* (Finkel *et al.*, 2017), sendo a principal troca delas a c.840C>T que altera o sítio de *splicing* e acarreta na exclusão do exon 7 durante a transcrição. Essa exclusão resulta em uma proteína parecida com a expressa pelo *SMN1*, porém possui níveis menores de eficiência (Baioni; Ambiel, 2010; Vitte *et al.*, 2007).

Um indivíduo saudável que não é portador da doença apresentaria 2 cópias de *SMN1* e 2 cópias de *SMN2*. Pessoas afetadas pela AME tem 0 cópias para o gene *SMN1*, e podem divergir em número de cópias de *SMN2*. Como o *SMN2* produz uma proteína parecida porém com uma eficiência mais baixa, acaba desempenhando o papel de protetor de progressão, então quanto mais cópias de *SMN2*, mais proteína SMN de baixa eficiência será produzida, suprimindo de alguma maneira a falta do gene *SMN1*. Existem 5 principais fenótipos de AME que são baseados em números de cópias de *SMN2* e características clínicas apresentadas pelos pacientes (Zanoteli *et al.*, 2024).

2.3.1 Aspectos Clínicos

A AME é usualmente classificada em cinco tipos, de acordo com a idade de início da doença e a máxima função motora adquirida, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Classificação clínica e correlação com o número de cópias do gene *SMN2*.

Tipo AME	Prevalência	Início sintomas	Habilidade motora máxima	Subclassificação	Nº de cópias de <i>SMN2</i>
Tipo 0	Não conhecida	Pré natal	nenhuma	-	1 cópia
Tipo 1	60%	0-6 meses	Segura a cabeça	1A: inicia <1 mês 1B: inicia em 1-3 meses 1C: inicia entre 3-6 meses	1-2 cópias
Tipo 2	27%	7-18 meses	Senta	2A: Senta sem suporte e perde a capacidade 2B: Senta sem suporte e mantém a habilidade	3 cópias em mais de 70% dos pacientes
Tipo 3	12%	>18 meses	Anda	3A: Inicia entre 18-36 meses 3B: Inicia após 36 meses	3-4 cópias em mais de 95% dos pacientes
Tipo 4	1%	>18 anos	Anda	-	4 ou mais cópias em mais de 90% dos pacientes

Zanoteli *et al.*, 2024.

2.3.2 Aspectos genéticos

A AME possui herança autossômica recessiva, sendo causada por variantes no gene *SMN1*, localizado no cromossomo 5q11.2-q13.3. O *locus* do *SMN* é constituído por dois genes parálogos, sendo um deles telomérico (*SMN1*) e o outro centromérico (*SMN2*). Os genes *SMN1* e *SMN2* possuem diferença em apenas 11 nucleotídeos, sendo uma delas, a substituição c.840C>T a mais relevante para o entendimento da AME (Finkel *et al.*, 2017). Esta substituição ocorre em um *exonic splicing enhancer* que regula a inclusão do éxon 7 deste gene, fazendo com que apenas 10-25% das transcrições *SMN2* contenha o éxon 7, responsável por gerar proteína funcional completa SMN; os outros 75-90% darão origem a uma proteína deficiente e instável (SMN Δ 7) (**Figura 2**), que será rapidamente degradada. A ausência do

SMN1; portanto, pode ser causada pela deleção do éxon 7 ou, então, devido a uma conversão gênica que modifica o *SMN1* em *SMN2* (Baioni; Ambiel, 2010; Vitte *et al.*, 2007).

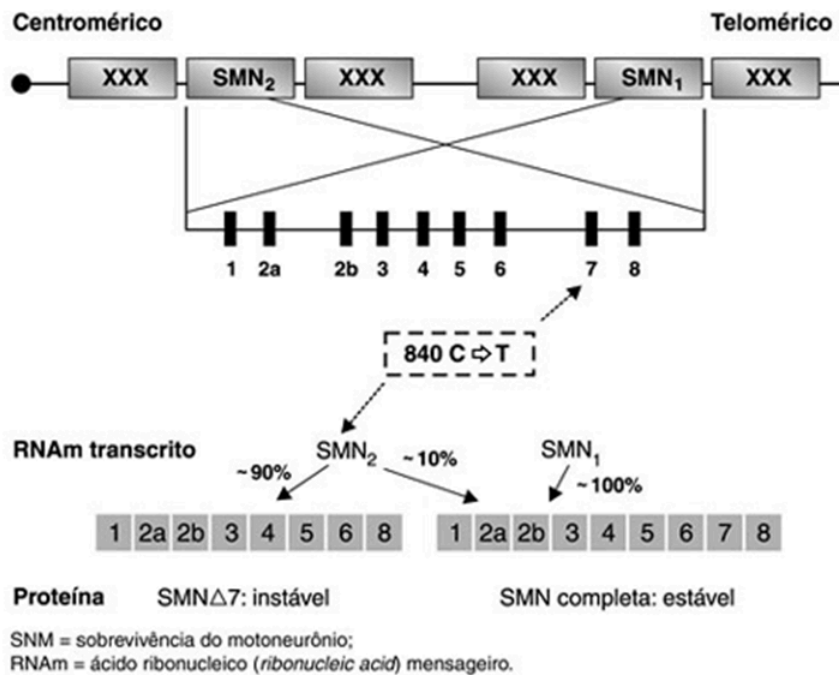


Figura 2- Estrutura do gene *SMN* no cromossomo 5 (Baioni, 2010).

Estudos realizados em diferentes grupos étnicos mostraram que cerca de 90-95% dos indivíduos, na maioria crianças com diagnóstico clínico dos tipos I, II e III de AME, apresentam deleção do éxon 7 em ambas as cópias do *SMN1*, isto é, eles são homozigotos para esta deleção. Contudo, quando crianças com quadros clínicos mal definidos (hipotonia, fraqueza muscular proximal, perda de deambulação) ou adultos (tipo III e IV) são incluídos, a presença de deleção em homozigose cai para menos de 50%. Além disso, cerca de 2-5% dos indivíduos que preenchem os critérios clínicos de AME apresentam a deleção do éxon 7 do *SMN1* em um único alelo, sendo imprescindível a pesquisar variantes de ponto nestes casos para confirmação diagnóstica (Alexandra; Ramos; Cabello, 2005). Conforme já mencionado, o fenótipo (dos tipos I, II, III e IV) está principalmente relacionado ao número de cópias presentes no *SMN2*, (**Quadro 1**) em que os pacientes com formas mais brandas apresentam um número maior de cópias deste gene (Finkel *et al.*, 2017b; Mercuri; Bertini; Iannaccone, 2012).

Quadro 1: Tipos clínicos e número de cópias *SMN2*.

AME	Número de Cópias:
Tipo I	1 ou 2 cópias <i>SMN2</i> – em 80% dos pacientes
Tipo II	3 cópias <i>SMN2</i> – em mais de 80% dos pacientes
Tipo III	3 ou 4 cópias de <i>SMN2</i> – em 96% dos pacientes
Tipo IV	4 ou mais cópias de <i>SMN2</i>

Além da forma clássica do portador de AME que carrega uma cópia de *SMN1* em cada alelo (1+1), existe também o portador silencioso que ocorre quando um paciente apresenta 2 cópias de *SMN1* no mesmo alelo e 0 em outro (2+0), ou uma conversão do gene *SMN2* em *SMN1* (2+0) (Chen *et al*, 2020, Ceylan *et al*, 2020). Com isso, mesmo apresentando 2 cópias de *SMN1* existe a possibilidade de uma pessoa “saudável” ser um portador silencioso, já que os testes amplamente utilizados hoje não conseguem identificar essa condição.

Estudos mais recentes apontam outros modificadores do fenótipo como o polimorfismo c.859G>C no *SMN2*, o qual cria um local para ação de um *splicing enhancer*, aumentando a inclusão do éxon 7 do gene *SMN2* e com isso aumentando a quantidade da proteína SMN funcional (Bernal *et al.*, 2010). Há diversas descrições de indivíduos com 2 cópias do *SMN2* (com previsão de fenótipo de AME tipo 1) que quando tem esta variante em homozigose apresentam o fenótipo tipo III e em heterozigose tipo II ou tipo III. Entretanto este polimorfismo é raro, e sua frequência é de 0.003248 na base do GnomAD, variando de 0.0075 no Sul da Ásia até 0.0005 em populações africanas (Lek *et al*, 2016).

2.4 Diagnóstico

A suspeita diagnóstica da AME é feita com base nos sinais clínicos associados a alterações eletrofisiológicas (pela eletroneuromiografia, ENMG). A maioria das diretrizes mais recentes consideram que a análise molecular do gene *SMN1*, com a pesquisa da deleção comum do éxon 7 em homozigose, deve ser o primeiro passo após a suspeita clínica, com base no exame físico. Caso a deleção for encontrada o diagnóstico estará firmado. Caso o exame não venha a encontrar a deleção devem ser realizados estudos eletrofisiológicos e dosagem de creatinofosfoquinase (CPK) (D’Amico *et al.* 2011). A creatinofosfoquinase (CPK) em geral estará normal, mas em casos atípicos podem estar aumentados em até cinco vezes, o que pode dificultar o diagnóstico diferencial com as distrofias musculares, que

também cursam com fraqueza proximal e caracteristicamente tem elevação da CPK. A eletroneuromiografia terá papel essencial em especial nos casos de AME tipo II, III ou IV ou casos mais atípicos, sendo capaz de diferenciar entre acometimentos do neurônio motor, de raízes ou nervos periféricos, da junção neuromuscular ou da própria fibra muscular. A alteração eletrofisiológica na AME é um padrão de desnervação com neuroconduções normais em nervos motores e sensitivos. Os potenciais de fibrilação no repouso identificados pela eletromiografia são encontrados tanto em afecções do corno anterior da medula quanto dos nervos periféricos, sendo que as neuroconduções (como explicado acima) auxiliarão nesta diferenciação (alteradas nas neuropatias periféricas). Além disso, na AME, como há redução das unidades motoras, os motoneurônios remanescentes terão de inervar um número de fibras musculares levando a potenciais de unidade motora de duração e amplitude aumentada (potenciais gigantes). Caso a ENMG seja compatível com uma doença do corno anterior da medula, deverá ser avaliado o número de cópias do *SMNI* por MLPA, e caso seja encontrado apenas 1 cópia normal, deve-se prosseguir com o sequenciamento completo do gene *SMNI*, caso haja 2 cópias do *SMNI* devem ser considerados diagnósticos diferenciais alternativos (D'Amico *et al.* 2011). As técnicas de diagnóstico molecular serão detalhadas na próxima seção.

Em pacientes com AME, podem ser encontradas diversas alterações musculares. Algumas alterações histopatológicas são características, como a presença de fibras musculares atroficas, tanto do tipo I quanto do tipo II, hipertrofia de fibras tipo I ou agrupamento de tipo de fibras. Entretanto, essas alterações podem também ser encontradas em outros casos de desnervação. Dessa forma, esse tipo de exame não pode ser confirmatório para AME, e sim mais um dado clínico a ser considerado. Nas formas de evolução mais lenta, a interposição de alterações miopáticas secundárias, como fibras angulares, núcleos centrais, fendas e desarranjo miofibrilar, aumenta com a evolução da doença (Baioni 2010).

2.5 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular de AME em geral é dado através de ensaios semi-quantitativos que buscam a ausência do éxon 7 do gene *SMNI* em homozigose. Tais testes apresentam sensibilidade entre 95 a 98% e especificidade de 100% (D'Amico *et al.* 2011). Deleção em homozigose dos éxons 7 e 8 de *SMNI* podem ser detectadas por métodos como PCR-SSCP (*polymerase chain reaction – single – strand conformation polymorfism*) e

PCR-RFLP (*polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*). A análise por PCR-SSCP por detectar também alterações não patogênicas, foi praticamente substituída pela PCR-RFLP. Contudo, a análise semi-quantitativa não permite a detecção de heterozigotos, ou seja, não permite detectar portadores, nem indivíduos doentes heterozigotos compostos (com a deleção comum em um dos alelos e a variante de ponto no outro).

Os métodos mais sensíveis para o diagnóstico dos pacientes com AME e que são capazes de identificar portadores são os métodos quantitativos tais como PCR quantitativo em tempo real e análise por amplificação multiplex de sondas dependentes de ligação (MLPA). (Sugarman, 2012). Em um estudo, utilizaram o protocolo de avaliação do número de cópias do *SMN1* e do *SMN2* através da técnica SMP, chamada de *paralogous gene copy-number analysis by ratio and sum* (PGCNARS) foi validada em 6.738 amostras. O alto grau de homologia entre os genes *SMN1* e *SMN2* dificulta em muito a avaliação destes genes por técnicas de sequenciamento, sendo necessário um tratamento bioinformático diferenciado para o alinhamento correto das sequências. A sensibilidade do teste para detecção de portadores (1:0) foi de 100%, com especificidade de 99,6%. Cabe ressaltar que esta técnica foi capaz de identificar o SNP g.27134T>G que está ligado ao status de portador 2:0, e que não seria detectado por MLPA convencional. A técnica também foi capaz de detectar variantes de ponto no *SMN1* no mesmo exame (Feng *et al*, 2017). Tal estudo foi suficiente para sugerir o NGS como uma das técnicas de padrão-ouro para o diagnóstico de AME junto com MLPA e qPCR nas últimas diretrizes internacionais para o diagnóstico da condição, recentemente publicadas em 2018 (Mercuri *et al*, 2018).

Oliveira Netto *et al.*, 2023 utilizou a técnica de qPCR como método de triagem com amostras de sangue impregnado em papel filtro oriundas do teste do pezinho. Através de kit comercial SALSA® MC002 SMA Newborn Screen é realizado a detecção da presença dos genes *SMN1* e *SMN2*, onde após identificada a ausência de cópias de *SMN1* é realizado a técnica confirmatória, MLPA.

As variantes de ponto podem ser identificadas por sequenciamento de Sanger ou SMP, tendo sido descritas 123 variantes de ponto, inserções e deleções no *SMN1* até 2024. Entretanto, em até 1/3 dos casos com clínica sugestiva e deleção do éxon 7 do *SMN1* em 1 dos alelos a segunda variante patogênica não é encontrada, sugerindo a possibilidade de variantes em regiões intrônicas usualmente não avaliadas (D'Amico *et al*. 2011).

2.6 Epidemiologia

A incidência da AME é estimada em 1:6.000 a 1:10.000 nascidos vivos (Oliveira Netto *et al.*, 2023) e a taxa de frequência de indivíduos portadores (heterozigotos) em 1:40 a 1:60 indivíduos na população em geral (Baioni, 2010), variando de 1 em 47-48 para populações norte-americanas e taiwanesas, e de 1 em cada 78 ou mais habitantes em populações americanas de afrodescendentes (Mercuri *et al.*, 2012; Sugarman *et al.*, 2012). Um estudo em população da África sub-Saariana encontrou uma frequência de portadores de variantes no *SMN1* de 1:209 indivíduos, sendo bem inferior à reportada nas populações europeias. Adicionalmente estas populações tinham maior probabilidade de portarem 3 cópias do *SMN1* e nenhuma cópia do *SMN2* do que populações da Eurásia (Sangaré *et al.*, 2014)

Um estudo brasileiro objetivou avaliar a frequência de portadores de deleções no *SMN1* em 150 indivíduos saudáveis não relacionados, utilizando a metodologia de DHPLC (cromatografia líquida desnaturante de alta eficiência). A frequência de 2,7% de portadores foi encontrada nesta população, sendo muito similar a outras áreas do mundo tais como França, Polônia e Alemanha, apenas pacientes residentes da região sudeste do Brasil foram pesquisados (Bueno, 2011). Outro estudo mais recente, Oliveira Netto *et al.*, 2023, apresentou dados que corroboram com a incidência estimada de 1 a cada 10.000 nascidos vivos, utilizando o kit SALSA® MC002 SMA Newborn Screen, para o uso em amostras oriundas do teste do pezinho. Foram identificados 4 pacientes com deleção em homozigose para *SMN1* em 40.000 amostras analisadas.

2.7 Fisiopatologia

A proteína SMN está amplamente distribuída em todas as células do corpo, tanto no citoplasma quanto no núcleo das células. No núcleo, a SMN une-se a determinadas estruturas envolvidas com a remoção de sequências não-codificantes (íntrons) do pré-RNA mensageiro. Adicionalmente, a *SMN* também parece ter participação na regulação da transcrição e na expressão de determinados genes. Apesar dos avanços no conhecimento dos papéis celulares e interações da SMN, não está claro o motivo da predileção pela degeneração dos motoneurônios α em sua deficiência, bem como qual concentração da proteína seria necessária para um funcionamento ótimo destas células. Uma das hipóteses para esta especificidade tecidual seria a de a *SMN* ter uma função adicional restrita a esses neurônios

(Mark FB e Barry WC, 2017). Nesse contexto, estudos imuno-histoquímicos têm localizado a *SMN* em dendritos, cones de implantação e axônios de motoneurônios, sugerindo um papel no transporte de RNA ao longo dos axônios. Adicionalmente, foi observado em modelos de AME por *knockout* do *SMN* em camundongos e *zebrafish* que os motoneurônios apresentam axônios com ramificações aberrantes e que há falhas da *SMN* em alcançar a placa motora, sendo uma evidência convincente do importante papel da *SMN* no desenvolvimento morfológico e na migração axonal destes neurônios (Baioni, 2010). A proteína *SMN* também é encontrada pós-sinápticamente na junção neuromuscular e dentro das bandas Z do músculo estriado, indicando que a patogênese não envolve exclusivamente o corpo celular do motoneurônio, podendo afetar também a própria fibra muscular e a placa motora. Cabe ressaltar que casos de indivíduos com ausência completa da proteína *SMN*, isto é, pacientes com AME e que apresentam também ausência do gene *SMN2*, nunca foram reportados. Isto porque, provavelmente, esse genótipo seja incompatível com a vida, podendo a proteína *SMN* ter um papel essencial durante o desenvolvimento embrionário ou apresentar uma função moduladora na apoptose neuronal (Baioni, 2010, Vitte *et al.* 2017).

2.8 Progressão e Tratamento

Em razão de seu curso progressivo a AME necessita de vários cuidados especiais, abrangendo terapias de suporte por equipes multidisciplinares, envolvendo cuidados nutricionais, ortopédicos, respiratórios e fisioterapêuticos. O estabelecimento de um correto diagnóstico será fundamental no plano terapêutico bem como para a realização do adequado aconselhamento genético.

Até 2016 o tratamento consistia apenas em medidas de suporte, mas avanços recentes foram realizados no entendimento da fisiopatologia da AME, possibilitando o surgimento de novas propostas terapêuticas. Em dezembro de 2016, o órgão regulatório americano, FDA (Food and Drug Administration), aprovou a Nusinersena (Spiranza), um oligonucleotídeo antisense (ASO) para o tratamento da AME. A Nusinersena é uma sequência de fita única de ácido nucleico designada a regiões específicas do pré-RNA_m (ácido ribonucleico pré-mensageiro), modulando a expressão genética. Ele permite que o éxon 7 seja incluído durante o processamento do RNA_m transcrito a partir do gene *SMN2*, garantindo a leitura e a tradução correta deste gene, potencializando a síntese de proteínas *SMN* funcionais (Goodkey

et al, 2018; Rao *et al*, 2018). Em 2019, o Onasemnogene abeparvovec (Zolgesma) foi aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de crianças com AME menores de 2 anos de idade e com variante bi-alélica no gene *SMN1*. Onasemnogene abeparvovec é um vetor adenoviral designado a entregar uma cópia humana funcional do gene *SMN* aos neurônios motores de pacientes com AME (Sheridan M Hoy,2019). Mais recentemente, em agosto de 2020, o Risdiplam (Evrysdi) que é um modificador do processo transcricional do RNA direcionado ao gene *SMN2*, também foi aprovado pelo FDA como tratamento de pacientes com AME maiores de 2 meses de idade. Este fármaco, cuja administração é via oral, atua aumentando a inclusão do éxon 7 nos transcritos do RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) do gene *SMN2*, impulsionando a capacidade deste gene produzir proteínas SMN funcionais (Sohita Dhillon, 2019). Novamente ressaltamos que os três tratamentos mencionados também foram mais recentemente aprovados pela ANVISA.

2.9 Sequenciamento Massivo Paralelo

O Sequenciamento Massivo Paralelo (SMP), também conhecido como NGS, do inglês Next Generation Sequence, é uma metodologia utilizada para avaliar e detectar variantes de ponto, deleções, duplicações, pequenas inserções e número de cópias de diversos genes e doenças. É uma ferramenta de análise que possibilita a avaliação de um grande volume de informação genética de maneira rápida e confiável, sendo uma evolução do sequenciamento de Sanger, o SMP possibilita em um tempo muito pequeno o sequenciamento de diversas regiões do genoma(Xuan *et al*, 2017; Liu *et al*, 2012),

Esta tecnologia robusta é capaz de em um mesmo teste identificar e avaliar diversas doenças ao mesmo tempo e com uma fração muito baixa de material genético. Se tornando uma opção de uso muito boa pois amostras das mais diversas matrizes, como sangue impregnado em papel filtro, tecido em parafina, sangue periférico, swab nasal entre outros, conseguem atingir os requisitos mínimos para a técnica(Van Campen *et al*, 2019; Boemer *et al*, 2017; Cappello *et al*, 2022; McDonough *et al*, 2019; Gularte *et al*, 2022) .

Com os avanços tecnológicos, é possível realizar SMP de painéis de genes, do exoma ou mesmo do genoma completo, sendo a diferença entre as análises a quantidades de leituras, capacidade de processamento de dados e análises pós-corridas.

Existem diferentes plataformas de SMP, que em geral seguem uma configuração de passos similar, mas que são diferenciadas pelo método de identificação e incorporação de bases e de construção da sequência (Dijk *et al*, 2014). Inicialmente é feita a avaliação da qualidade e quantidade de amostra disponível, existem diversas matrizes biológicas que podem ser utilizadas, entretanto a disponibilidade de material e a qualidade podem divergir. Após a avaliação de viabilidade da amostra é realizada a construção da biblioteca, isso é a organização, identificação e amplificação de regiões de interesse de cada análise. São adicionadas às amostras, barcodes ou index que garantem a identificação individual de cada amostra, regiões de ligação de primers genéricos utilizados durante a amplificação e sequenciamento, e adaptadores. A biblioteca é a preparação das amostras para o sequenciamento, como durante o SMP todas as amostras são colocadas juntas, como um *pool*, para serem sequenciadas, estes passos garantem que a corrida seja capaz de distinguir as sequências lidas de cada amostra e que as regiões de interesse sejam sequenciadas (Dijk *et al*, 2014).

2.9.1 Illumina

A plataforma Illumina utiliza uma metodologia de sequenciamento por detecção de emissão de luz na incorporação de um nucleotídeo fluorescente à sequência alvo. A identificação de qual cor foi emitida e, em qual momento, gera os dados da sequência, tudo ocorre junto a *flow cell*, que consiste em uma lâmina de vidro impregnada de oligos, correspondentes a regiões de ligação, que fixam as sequências a *flow cell* (Xuan *et al*, 2017; Liu *et al*, 2012).



Figura 3 - Plataforma de sequenciamento MiSeq (Illumina,USA).

Primeiro é realizada a amplificação das sequências, através dos oligonucleotídeos, conhecida como amplificação por pontes, como resultado temos um aglomerado de sequências alvo, chamado *cluster*. O sequenciamento é feito a partir da incorporação da uma base complementar a sequência ligada aos oligos, a cada ciclo os 4 nucleotídeos fluorescentes competem para incorporar a sequência que após a ligação liberam a fluorescência correspondente a sua base. A emissão de luz é gerada e captada, como uma foto a cada ciclo de incorporação, e assim é identificado que base foi ligada e em que local que se ligou, este método é chamado de sequenciamento por síntese (Illumina, USA; Liu *et al*, 2012).

O processo de sequenciamento é dividido em dois momentos principais, o sequenciamento das sequências *forward*, 5', e após das sequências reversas, 3', chamado sequenciamento por pares. Os dados gerados são analisados através da criação de clusters, ou agrupamento de leituras, alinhado às leituras *forward* e reverso. Assim são formadas sequências contínuas, avaliando as bases identificadas fazendo a chamada de variante, ou seja, identificando locais onde as leituras apresentam bases que não são compatíveis com o genoma utilizado como referência (Illumina, USA).

2.9.2 Ion Torrent

O sequenciamento por meio da plataforma Ion Torrent ocorre através da detecção de mudança de pH, ou seja, com a incorporação de uma nova base, íons de hidrogênio são

liberados. Um condutor detecta a mudança e quantifica, enviando o sinal de mudança de pH, cada um dos 4 nucleotídeos incorporados alteram o pH de acordo com a quantidade de íons de hidrogênio liberados (Gupta; Gupta, 2014).

Diferente da tecnologia Illumina, não são utilizadas sequências longas e amplificação por pontes. As sequências das regiões alvo previamente selecionadas, são fragmentadas em sequências menores que cobrem pequenas esferas, conhecido como pcr por emulsão. Essas esferas se alocam nos poços de uma *flow cell* ou *chip*, que neste caso agem como um condutor de sinal elétrico.

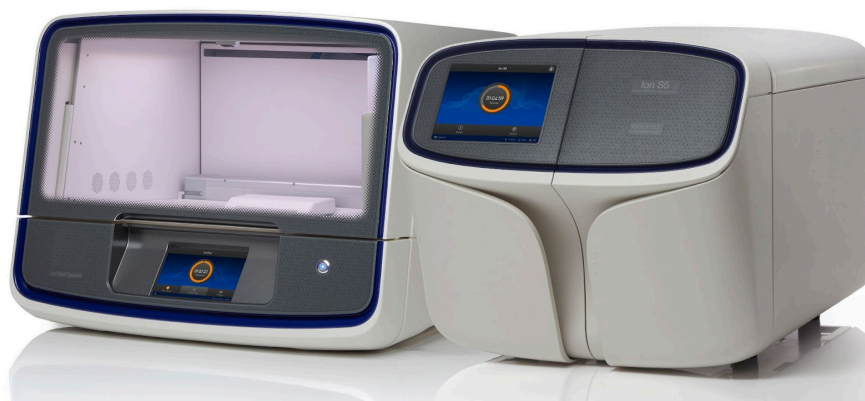


Figura 4 - Sistema Ion GeneStudio S5 com o Sistema Ion Chef (Thermo Fisher,USA).

A cada ciclo as esferas que estão em cada poço individualmente são submersas em soluções específicas de um nucleotídeo por ciclo. Quando ocorre a incorporação do nucleotídeo à sequência correspondente, os íons liberados na solução são identificados e os sinais elétricos emitidos. Os dados gerados são gerados a partir do sinal elétrico emitido, a diferença de pH a cada ciclo constrói a sequência.



Figura 5 - Ion 510™ (Thermo Fisher,USA).

2.10 SMP para o diagnóstico de AME

Artigos mais recentes apresentam a tecnologia do SMP para o diagnóstico de AME, apontando diversas estratégias de uso tanto a partir de sequenciamento do exoma, do genoma e de painéis como métodos diagnósticos válidos, tanto para avaliação de número de cópias de *SMN1* e *SMN2* quanto das variantes de ponto encontradas nos genes *SMN1* e *SMN2*. Detalharemos os principais pontos de cada um desses estudos abaixo.

Larson *et al.* 2015, expôs uma forma de análise baseada nos dados gerados através do SMP de painel de 552 genes para a inferência da probabilidade de uma pessoa ser portadora de AME que utiliza a hierarquia Bayesiana. Após, a pipeline foi testada em bases de dados populacionais utilizando dados de genomas (projeto 1000 genomas) para estimar a probabilidade e a frequência de portadores de AME.

Feng *et al.* 2017, apresentaram uma forma de utilização de painel desenvolvido para AME, que contém regiões de controle dentro dos genes *SMN1* e *SMN2*, capaz de identificar deleções e duplicações, discriminar e quantificar o número de cópias de *SMN1* e *SMN2*. Essa metodologia aplica a análise através da razão de leituras de regiões, tendo a normalização de leitura por regiões controle de 158 genes. Tan *et al* 2020, realizaram um estudo onde junto a um painel de 122 genes de doenças relacionadas a distrofias musculares, miopatias hereditárias e síndrome miastênica congênita incluiu os genes *SMN1* e *SMN2* em específico a região de interesse do exons 7 respectivo de cada gene. Tan *et al*, também salientam a

concordância entre as técnicas de NGS e PCR quantitativo (qPCR), onde nos casos do número de cópias de *SMN1* foi de 100%, já no número de cópias de *SMN2* teve discrepâncias entre NGS e qPCR, quando detectado 2 cópias de *SMN2* a concordância entre as técnicas foi de 93% e quando detectado 3 cópias de *SMN2* foi de 91%.

Lopez-Lopez *et al* 2020, retratam uma outra estratégia de análise com o painel adotando mais regiões de controle, 20 genes ao todo, não relacionados a AME, que auxiliam na normalização das leituras. Também apresenta uma ferramenta gratuita em linguagem Python capaz de realizar a detecção de portadores e a análise de número de cópias absolutas de *SMN1* a partir de dados gerados por SMP. Já Chen *et al* 2020, utilizaram um método distinto dos demais, através de sequenciamento do genoma foi capaz de discriminar e quantificar os números de cópias de *SMN1* e *SMN2*, também propôs que é possível identificar variantes de ponto e uma maneira de identificar os portadores silenciosos. Ao realizar um sequenciamento genômico, foi possível elaborar a normalização das leituras nas regiões dos genes alvo, utilizando outras regiões que não estão ligadas a AME como controle.

Zhao *et al* 2022, realizou a técnica com um painel que apresentava o gene *SMN1* e mais 237 genes, a fim de avaliar a confiabilidade da tecnologia SMP na detecção da deleção do gene *SMN1*. Sendo comparado com MLPA e qPCR, o SMP teve um excelente desempenho, dentro dos padrões utilizados com genes que serviram de regiões alvo, normalizando as leituras. Shum *et al* 2023, também utiliza um painel com 176 genes para avaliar a deleção comum do *SMN1*. Realizando inicialmente uma validação com 16 controles, dividindo em dois, deletados em homozigose para o exon 7 *SMN1* e outro com portadores e sem deleção do exon 7 *SMN1*.

Blasco-Perez *et al* 2020, empregaram a técnica de SMP para a avaliação do gene *SMN2*, para uma análise extensiva do gene em busca de avaliar polimorfismos de nucleotídeo único e variantes raras. Já no artigo de 2022 Blasco-Perez *et al*, apresenta a variante c.859G>C, como um modificador positivo de fenótipo, através dessa investigação profunda do gene *SMN2*. Bowen *et al*. 2021, realizou testes em indivíduos que são confirmados ou suspeitos para AME, utilizando SMP, e MLPA para identificar dentro desse grupo pacientes que apresentam variantes patogênicas no *SMN1*, deleção no exon 7 *SMN1*, e variantes VUS

em *SMN1* e *SMN2*. Sendo capaz de apresentar um rendimento de diagnóstico (casos fechados) e quase diagnósticos (que precisam de melhor avaliação) de 31,3% (n= 771/2,459).

Weisburd *et al* 2024, apresenta uma nova ferramenta, *SMA FINDER* capaz de identificar casos subdiagnosticados de AME em banco de dados de genomas, exomas e painéis. Identificando a deleção através da posição c.840, que diferencia *SMN1* de *SMN2*. O *SMN FINDER*, apresenta o valor preditivo positivo de 96%. Entretanto ainda apresenta limitações, não podendo distinguir portadores de pacientes sem a deleção em heterozigose e sem conseguir quantificar o número de cópias de *SMN2*.

É importante ressaltar que as publicações apresentadas utilizaram a tecnologia do SMP na plataforma de sequenciamento Illumina, que apresenta em seu pipeline o recurso de análise de número de cópias, como o CODE-SEQ (Ceylan *et al* 2020) mas que também permite a liberdade dos grupos de pesquisa em estabelecer modelos de análise como no caso de Lopez-Lopez *et al* com o recurso em python ou como em Weisburd *et al* com o *SMA FINDER*.

3. MARCO CONCEITUAL

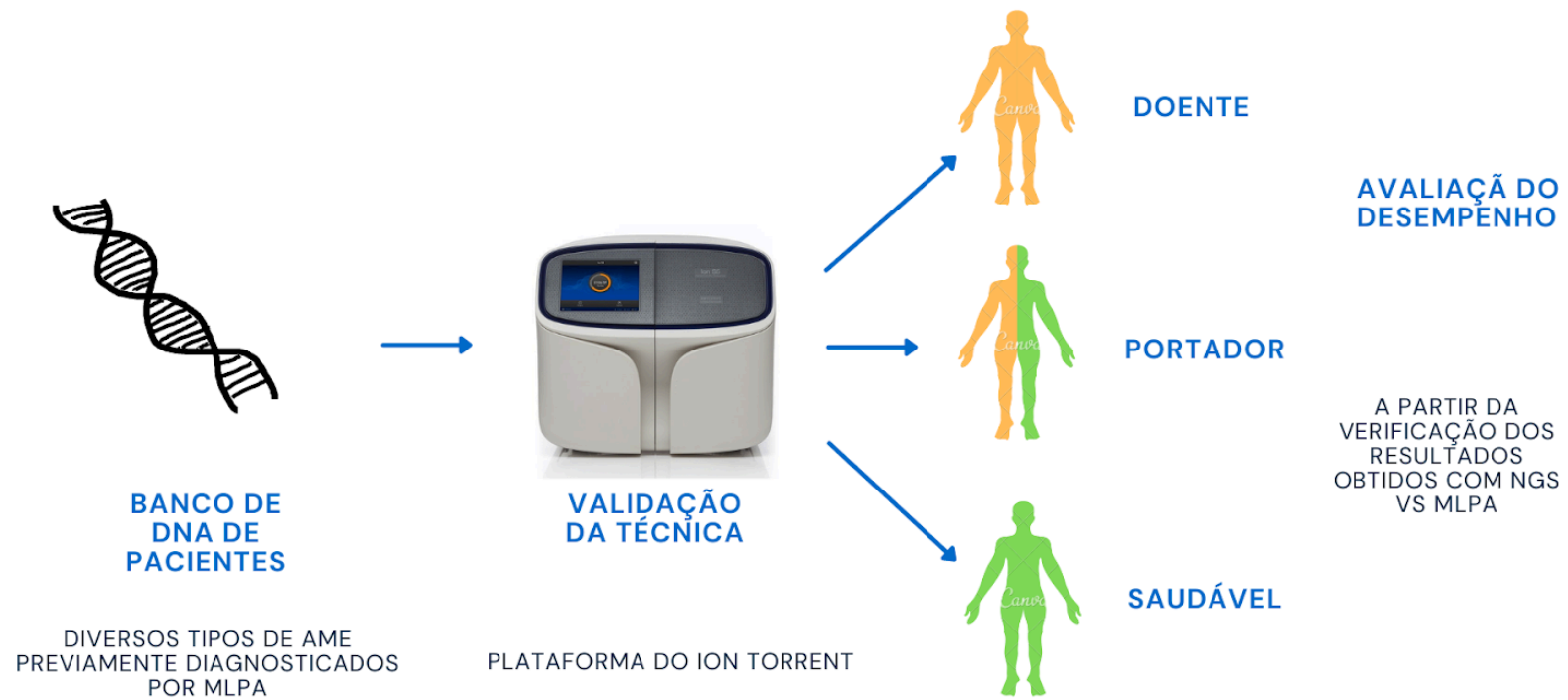


Figura 6 – Marco Conceitual.

4. JUSTIFICATIVA

A utilização do SMP foi recentemente avaliada de modo isolado ou em painéis de genes relacionados a doenças neuromusculares contendo os genes *SMN1/SMN2*. Entretanto, os estudos ainda são poucos e existem diferentes plataformas e metodologias para o sequenciamento de nova geração que necessitam ser testadas, bem como é necessário o desenvolvimento de pipelines específicos automatizados para a detecção de grandes deleções que são o tipo mais frequente de variantes patogênicas causadoras de AME.

A utilização do SMP para o diagnóstico de AME foi validado na plataforma Illumina, entretanto a tecnologia que temos disponível no HCPA é a plataforma Ion Torrent, tornando-se necessário a padronização da análise dos genes *SMN1/SMN2* nesta plataforma, também utilizada por diversos outros grupos. Apesar de o MLPA e o qPCR serem testes adequados e viáveis para o diagnóstico de AME, o NGS pode ser uma alternativa para preencher algumas lacunas desses métodos, como a existência de fenótipos discordantes do genótipo predito pelo número de cópias do *SMN2* e por detectar variantes de ponto no mesmo exame.

O governo brasileiro fez uma alteração na lei nº 8.069, que discorre sobre aperfeiçoamento do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), aumentando o rol de doenças analisadas. Nesta alteração, foi incluída uma 5ª etapa de expansão do programa, a qual inclui a triagem neonatal para AME no território brasileiro. Sendo assim, existe uma necessidade inadiável da disponibilização de diferentes técnicas moleculares para o diagnóstico de AME que possam vir a ser utilizadas em contexto de triagem neonatal no Brasil.

O SMP parece ser uma técnica robusta e que trará mais informações em um único exame ao permitir a identificação de pacientes com AME heterozigotos compostos para deleção comum e variantes de ponto e a identificação de variantes genéticas que sabidamente modificam o fenótipo clínico e justificam grande parte da discordância entre número de cópias de *SMN2* e fenótipo clínico. Considerando que todas as terapias avançadas aprovadas para o tratamento de AME (modificadores do *SMN2* e terapia gênica) tiveram seus melhores resultados quando aplicadas em indivíduos pré-sintomáticos e que a triagem neonatal será a melhor forma de identificar esses casos antes do início dos sintomas e considerando que como no caso de detecção de pacientes por triagem neonatal não teremos ainda fenótipo clínico,

será fundamental termos informações que sejam as mais precisas possível para predição do fenótipo. Dito de outro modo, pacientes com formas que teriam predição de início na adolescência ou vida adulta não precisariam ser tratados logo ao nascimento, diferente das formas infantis.

Desta forma, consideramos que o presente estudo trará acréscimos à literatura ao realizar a verificação do sequenciamento de nova geração com a Plataforma Ion Torrent S5 para diagnóstico de AME e estado de portador, bem como para detectar variantes modificadoras do fenótipo clínico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo de acurácia do painel customizado através da técnica de Sequenciamento Massivo Paralelo (SMP) para o diagnóstico de doentes e portadores de AME.

5.2 Objetivos Específicos

- Realizar verificação do painel customizado através da técnica de Sequenciamento Massivo Paralelo (SMP) para o diagnóstico de doentes (homozigotos) da deleção comum no Éxon 7 do gene *SMN1*
- Realizar verificação do painel customizado através da técnica de Sequenciamento Massivo Paralelo (SMP) para o diagnóstico de portadores (heterozigotos) da deleção comum no Éxon 7 do gene *SMN1*.
- Realizar verificação do painel customizado através da técnica de Sequenciamento Massivo Paralelo (SMP) para o diagnóstico de heterozigotos compostos que tenham a deleção comum e variante de ponto de ponto no *SMN1*.
- Avaliar a frequência de alterações intragênicas do *SMN1/SMN2* que sabidamente atuam como modificadoras de fenótipo na amostra testada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Araújo AP, Ramos VG, Cabello PH. Dificuldades diagnósticas na atrofia muscular espinhal [Diagnostic difficulties in spinal muscular atrophy]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005 Mar;63(1):145-9. Portuguese. doi: 10.1590/s0004-282x2005000100026. Epub 2005 Apr 13. PMID: 15830081.
- 2- Baioni MT, Ambiel CR. Spinal muscular atrophy: diagnosis, treatment and future prospects. *J Pediatr (Rio J)*. 2010 Jul-Aug;86(4):261-70. English, Portuguese. doi: 10.2223/JPED.1988. PMID: 20711542.
- 3- Bear, Mark F.; PARADISO, Michael A.; CONNORS, Barry W.. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 4 Porto Alegre: Artmed, 2017, 974 p
- 4- Bernal S, Alías L, Barceló MJ, Also-Rallo E, Martínez-Hernández R, Gámez J, Guillén-Navarro E, Rosell J, Hernando I, Rodríguez-Alvarez FJ, Borrego S, Millán JM, Hernández-Chico C, Baiget M, Fuentes-Prior P, Tizzano EF. The c.859G>C variant in the *SMN2* gene is associated with types II and III SMA and originates from a common ancestor. *J Med Genet*. 2010 Sep;47(9):640-2. doi: 10.1136/jmg.2010.079004. Epub 2010 Jun 24. PMID: 20577007.
- 5- Boemer F, Fasquelle C, d'Otreppe S, Josse C, Dideberg V, Segers K, Guissard V, Capraro V, Debray FG, Bours V. A next-generation newborn screening pilot study: NGS on dried blood spots detects causal mutations in patients with inherited metabolic diseases. *Sci Rep*. 2017 Dec 15;7(1):17641. doi: 10.1038/s41598-017-18038-x. PMID: 29247206; PMCID: PMC5732277.
- 6- Bueno KC, Gouvea SP, Genari AB, Funayama CA, Zanette DL, Silva WA Jr, Oliveira AB, Scola RH, Werneck LC, Marques W Jr. Detection of spinal muscular atrophy carriers in a sample of the Brazilian population. *Neuroepidemiology*. 2011;36(2):105-8. doi: 10.1159/000324156. Epub 2011 Feb 18. PMID: 21335981.
- 7- Calucho M, Bernal S, Alías L, March F, Venceslá A, Rodríguez-Álvarez FJ, Aller E, Fernández RM, Borrego S, Millán JM, Hernández-Chico C, Cuscó I, Fuentes-Prior P, Tizzano EF. Correlation between SMA type and *SMN2* copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord*. 2018 Mar;28(3):208-215. doi: 10.1016/j.nmd.2018.01.003. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29433793.
- 8- Cappello F, Angerilli V, Munari G, Ceccon C, Sabbadin M, Pagni F, Fusco N, Malapelle U, Fassan M. FFPE-Based NGS Approaches into Clinical Practice: The Limits of Glory from a Pathologist Viewpoint. *J Pers Med*. 2022 May 5;12(5):750. doi: 10.3390/jpm12050750. PMID: 35629172; PMCID: PMC9146170.
- 9- Ceylan, A.C., Erdem, H.B., Şahin, İ. et al. *SMN1* gene copy number analysis for spinal muscular atrophy (SMA) in a Turkish cohort by CODE-SEQ technology, an integrated solution for detection of *SMN1* and *SMN2* copy numbers and the “2+0” genotype. *Neurol Sci* 41, 2575–2584 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04365-x>
- 10- Chen X, Sanchis-Juan A, French CE, Connell AJ, Delon I, Kingsbury Z, Chawla A, Halpern AL, Taft RJ; NIHR BioResource; Bentley DR, Butchbach MER, Raymond FL,

Eberle MA. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data. *Genet Med*. 2020 May;22(5):945-953. doi: 10.1038/s41436-020-0754-0. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32066871; PMCID: PMC7200598.

11- D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis*. 2011 Nov 2;6:71. doi: 10.1186/1750-1172-6-71. PMID: 22047105; PMCID: PMC3231874.

12- Dhillon S. Risdiplam: First Approval. *Drugs*. 2020 Nov;80(17):1853–8.

13- Feng Y, Ge X, Meng L, Scull J, Li J, Tian X, Zhang T, Jin W, Cheng H, Wang X, Tokita M, Liu P, Mei H, Wang Y, Li F, Schmitt ES, Zhang WV, Muzny D, Wen S, Chen Z, Yang Y, Beaudet AL, Liu X, Eng CM, Xia F, Wong LJ, Zhang J. The next generation of population-based spinal muscular atrophy carrier screening: comprehensive pan-ethnic *SMN1* copy-number and sequence variant analysis by massively parallel sequencing. *Genet Med*. 2017 Aug;19(8):936-944. doi: 10.1038/gim.2016.215. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28125085.

14- Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, Chiriboga CA, Saito K, Servais L, Tizzano E, Topaloglu H, Tulinius M, Montes J, Glanzman AM, Bishop K, Zhong ZJ, Gheuens S, Bennett CF, Schneider E, Farwell W, De Vivo DC; ENDEAR Study Group. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2017 Nov 2;377(18):1723-1732. doi: 10.1056/NEJMoa1702752. PMID: 29091570.

15- Goodkey K, Aslesh T, Maruyama R, Yokota T. Nusinersen in the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Methods Mol Biol*. 2018;1828:69–76.

16- Gularte JS, da Silva MS, Filippi M, Demoliner M, Schallenberger K, Hansen AW, de Abreu Góes Pereira VM, Heldt FH, Girardi V, Weber MN, de Almeida PR, Abadi BL, Dornelles M, Bizarro CV, Machado P, Basso LA, Dellagostin OA, Fleck JD, Spilki FR. Viral isolation allows characterization of early samples of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.33 with unique mutations (S: H655Y and T63N) circulating in Southern Brazil in 2020. *Braz J Microbiol*. 2022 Sep;53(3):1313-1319. doi: 10.1007/s42770-022-00789-z. Epub 2022 Jul 1. PMID: 35778549; PMCID: PMC9428868.

17- Gupta, A. K., & Gupta, U. D. (2014). Next Generation Sequencing and Its Applications. *Animal Biotechnology*, 345–367. doi:10.1016/b978-0-12-416002-6.00019-5

18- Hoy SM. Onasemnogene Apeparvovec: First Global Approval. *Drugs*. 2019 Jul;79(11):1255–62.

19- Larson JL, Silver AJ, Chan D, Borroto C, Spurrier B, Silver LM. Validation of a high resolution NGS method for detecting spinal muscular atrophy carriers among phase 3 participants in the 1000 Genomes Project. *BMC Med Genet*. 2015 Oct 29;16:100. doi: 10.1186/s12881-015-0246-2. PMID: 26510457; PMCID: PMC4625734.

20- Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin

R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug 18;536(7616):285-91. doi: 10.1038/nature19057. PMID: 27535533; PMCID: PMC5018207.

21- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:251364. doi: 10.1155/2012/251364. Epub 2012 Jul 5. PMID: 22829749; PMCID: PMC3398667.

22- Lopez-Lopez D, Loucera C, Carmona R, Aquino V, Salgado J, Pasalodos S, Miranda M, Alonso Á, Dopazo J. *SMN1* copy-number and sequence variant analysis from next-generation sequencing data. *Hum Mutat*. 2020 Dec;41(12):2073-2077. doi: 10.1002/humu.24120. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33058415; PMCID: PMC7756735.

23- McDonough SJ, Bhagwate A, Sun Z, Wang C, Zschunke M, Gorman JA, Kopp KJ, Cunningham JM. Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. *PLoS One*. 2019 Apr 11;14(4):e0211400. doi: 10.1371/journal.pone.0211400. PMID: 30973937; PMCID: PMC6459541.

24- Mercuri E, Bertini E, Iannaccone ST. Childhood spinal muscular atrophy: controversies and challenges. *Lancet Neurol*. 2012 May;11(5):443-52. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70061-3. PMID: 22516079.

25- Mercuri E, Finkel RS, Muntoni F, Wirth B, Montes J, Main M, Mazzone ES, Vitale M, Snyder B, Quijano-Roy S, Bertini E, Davis RH, Meyer OH, Simonds AK, Schroth MK, Graham RJ, Kirschner J, Iannaccone ST, Crawford TO, Woods S, Qian Y, Sejersen T; SMA Care Group. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul Disord*. 2018 Feb;28(2):103-115. doi: 10.1016/j.nmd.2017.11.005. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29290580.

26- Oliveira Netto AB, Brusius-Facchin AC, Lemos JF, Pasetto FB, Brasil CS, Trapp FB, Saute JAM, Donis KC, Becker MM, Wiest P, Coutinho VLS, Castro S, Ferreira J, Silveira C, Bittar MFR, Wang C, Lana JM, França Junior MC, Giugliani R. Neonatal screening for spinal muscular atrophy: A pilot study in Brazil. *Genet Mol Biol*. 2023 Dec 11;46(3 Suppl 1):e20230126. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2023-0126. Erratum in: *Genet Mol Biol*. 2024 Feb 02;46(3 Suppl 1):e20230126er. PMID: 38091267; PMCID: PMC10718293.

27- Rao VK, Kapp D, Schroth M. Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy: An Emerging Treatment Option for a Devastating Disease. *J Manag Care Spec Pharm*. 2018 Dec;24(12-a Suppl):S3-16.

28- Sangaré M, Hendrickson B, Sango HA, Chen K, Nofziger J, Amara A, Dutra A, Schindler AB, Guindo A, Traoré M, Harmison G, Pak E, Yaro FN, Bricceno K, Grunseich C, Chen G, Boehm M, Zukosky K, Bocoum N, Meilleur KG, Daou F, Bagayogo K, Coulibaly

YI, Diakité M, Fay MP, Lee HS, Saad A, Gribaa M, Singleton AB, Maiga Y, Auh S, Landouré G, Fairhurst RM, Burnett BG, Scholl T, Fischbeck KH. Genetics of low spinal muscular atrophy carrier frequency in sub-Saharan Africa. *Ann Neurol*. 2014 Apr;75(4):525-32. doi: 10.1002/ana.24114. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24515897; PMCID: PMC4112719.

29- Shum BOV, Henner I, Cairns A, Pretorius C, Wilgen U, Barahona P, Ungerer JPI, Bennett G. Technical feasibility of newborn screening for spinal muscular atrophy by next-generation DNA sequencing. *Front Genet*. 2023 Jan 12;14:1095600. doi: 10.3389/fgene.2023.1095600. PMID: 36713073; PMCID: PMC9878289.

30- Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, Hussain M, Phillips AD, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet*. 2017 Jun;136(6):665-677. doi: 10.1007/s00439-017-1779-6. Epub 2017 Mar 27. PMID: 28349240; PMCID: PMC5429360.

31- Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlfes EM, Flynn K, Hendrickson BC, Scholl T, Sirko-Osadsa DA, Allitto BA. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens. *Eur J Hum Genet*. 2012 Jan;20(1):27-32. doi: 10.1038/ejhg.2011.134. Epub 2011 Aug 3. PMID: 21811307; PMCID: PMC3234503.

32- Tan CA, Westbrook MJ, Truty R, Kvitek DJ, Kennemer M, Winder TL, Shieh PB. Incorporating Spinal Muscular Atrophy Analysis by Next-Generation Sequencing into a Comprehensive Multigene Panel for Neuromuscular Disorders. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2020 Oct;24(10):616-624. doi: 10.1089/gtmb.2019.0282. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32721234.

33- Van Campen JC, Sollars ESA, Thomas RC, Bartlett CM, Milano A, Parker MD, Dawe J, Winship PR, Peck G, Grafham D, Kirk RJ, Bonham JR, Goodeve AC, Dalton A. Next Generation Sequencing in Newborn Screening in the United Kingdom National Health Service. *Int J Neonatal Screen*. 2019 Dec;5(4):40. doi: 10.3390/ijns5040040. Epub 2019 Nov 5. PMID: 31844782; PMCID: PMC6914376.

34- Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*. 2014 Sep;30(9):418-26. doi: 10.1016/j.tig.2014.07.001. Epub 2014 Aug 6. PMID: 25108476.

35- Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, Cook SF, Lochmüller H. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 Jul 4;12(1):124. doi: 10.1186/s13023-017-0671-8. PMID: 28676062; PMCID: PMC5496354.

36- Vitte J, Fassier C, Tiziano FD, Dalard C, Soave S, Roblot N, Brahe C, Saugier-veber P, Bonnefont JP, Melki J. Refined characterization of the expression and stability of the *SMN* gene products. *Am J Pathol*. 2007 Oct;171(4):1269-80. doi: 10.2353/ajpath.2007.070399. Epub 2007 Aug 23. PMID: 17717146; PMCID: PMC1988876.

37- Weisburd B, Sharma R, Pata V, Reimand T, Ganesh VS, Austin-Tse C, Osei-Owusu I, O'Heir E, O'Leary M, Pais L, Stafki SA, Daugherty AL, Bönnemann CG, Donkervoort S, Haliloğlu G, Kang PB, Ravenscroft G, Laing N, Scott HS, Töpf A, Straub V,

Pajusalu S, Ôunap K, Tiao G, Rehm HL, O'Donnell-Luria A. Detecting missed diagnoses of spinal muscular atrophy in genome, exome, and panel sequencing datasets. medRxiv [Preprint]. 2024 Feb 27:2024.02.11.24302646. doi: 10.1101/2024.02.11.24302646. PMID: 38405995; PMCID: PMC10889006.

38- Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett.* 2013 Nov 1;340(2):284-95. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.025. Epub 2012 Nov 19. PMID: 23174106; PMCID: PMC5739311.

39- Zanuteli E, Araujo APQC, Becker MM, Fortes CPDD, França MC Jr, Machado-Costa MC, Marques W Jr, Matsui C Jr, Mendonça RH, Nardes F, Oliveira ASB, Pessoa ALS, Saute JAM, Sgobbi P, Van der Linden H Jr, Gurgel-Giannetti J. Consensus from the Brazilian Academy of Neurology for the diagnosis, genetic counseling, and use of disease-modifying therapies in 5q spinal muscular atrophy. *Arq Neuropsiquiatr.* 2024 Jan;82(1):1-18. doi: 10.1055/s-0044-1779503. Epub 2024 Feb 5. PMID: 38316428; PMCID: PMC10843933.

40- Zhao S, Wang Y, Xin X, Fang Z, Fan L, Peng Z, Han R, Shi C, Zhang Y, Fan C, Sun J, He X. Next generation sequencing is a highly reliable method to analyze exon 7 deletion of survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene. *Sci Rep.* 2022 Jan 7;12(1):223. doi: 10.1038/s41598-021-04325-1. PMID: 34997153; PMCID: PMC8741787.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação teve como objetivo principal a verificação de painel customizado para a análise de CNVs com a metodologia de SMP. Iremos rever aqui novamente os objetivos específicos e tecer considerações sobre os resultados que foram obtidos.

Realizar verificação da técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para o diagnóstico de doentes (homozigotos) da deleção comum no Éxon 7 do gene SMN1.

O painel customizado de 4 genes apresentou acurácia diagnóstica adequada para esta finalidade.

Realizar verificação da técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para o diagnóstico de portadores (heterozigotos) da deleção comum no Éxon 7 do gene SMN1.

O painel customizado de 4 genes apresentou acurácia diagnóstica alta, porém não adequada para exames moleculares para esta finalidade.

Realizar verificação da técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para o diagnóstico de heterozigotos compostos que tenham a deleção comum e variante de ponto de ponto no SMN1.

O painel customizado de 4 genes não apresentou acurácia diagnóstica adequada para identificar a deleção comum no *SMN1*, entretanto o método foi capaz de detectar as variantes de nucleotídeo único nos dois pacientes em que a presença de tais variantes era conhecida.

Avaliar a frequência de alterações intragênicas do SMN1/SMN2 que sabidamente atuam como modificadoras de fenótipo na amostra testada.

Na amostra avaliada não foram encontrados pacientes com alterações intragênicas do *SMN1/SMN2* que sabidamente atuam como modificadoras de fenótipo. As regiões foram cobertas pelo painel, sendo a qualidade de sequenciamento adequada.

Concluimos que o painel customizado é válido no contexto de triagem diagnóstica para AME, dada a acurácia perfeita para a detecção de doentes. Isso é especialmente relevante no contexto de triagem neonatal em que a triagem deve detectar apenas os casos afetados e não os portadores. Entretanto, não podemos dizer que o teste pode ser considerado como uma ferramenta diagnóstica confirmatória, pois não conseguiu discriminar na mesma eficiência portadores de pacientes sem a deleção em heterozigose. Destacamos que o SMP segue como sendo um método acurado para tais diagnósticos, considerando o sucesso de tais análises por outros grupos com uma estratégia parecida, porém desenvolvidas a partir de grandes painéis de genes, exomas e genomas, com custo elevado. Não consideramos que a baixa acurácia tenha ocorrido devido a diferenças nas plataformas utilizadas, uma vez que recentemente foi lançado o painel comercial CarrierSeq (que avalia 418 genes incluindo *SMN1* e *SMN2*), que é capaz de realizar tais análises em equipamentos Ion Torrent.

Ou seja, nossos resultados mostram que para diferenciação de portadores da deleção comum e controles e para quantificação do número de cópias de *SMN2* é necessária a construção de um painel robusto com a presença de mais genes controles, especialmente por ser uma região com grande homologia e em que apenas poucos nucleotídeos diferem o exon 7 do *SMN1* do exon 7 do *SMN2*. Atualmente os custos relacionados ao sequenciamento de grandes painéis de genes, exomas e genomas são ainda muito elevados para o uso no contexto de triagem neonatal, mas é provável que tais preços reduzam ou que a detecção de mais doenças em um mesmo teste compensam o custo, e que no futuro o SMP seja uma das formas de diagnóstico e diagnóstico em triagem neonatal da AME.

9. PERSPECTIVAS

A partir das revisões e análises dos genes modificadores que foram incluídos no painel customizado, optamos por modificar a finalidade do uso de SMP na AME, movendo nosso foco de estudos diagnósticos para estudos prognósticos. Nossos próximos projetos nesta temática serão direcionados para um melhor entendimento dos genes modificadores da doença no Brasil e na construção de escores preditores do fenótipo mais acurados do a informação exclusiva do número de cópias do gene *SMN2*.

10. ANEXOS E/OU APÊNDICES

Section & Topic	No	Item	Reported on page #
TITLE OR ABSTRACT			
	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	45
ABSTRACT			
	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)	45
INTRODUCTION			
	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	46
	4	Study objectives and hypotheses	47
METHODS			
<i>Study design</i>	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)	48
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria	48
	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	48
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	48
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	49
<i>Test methods</i>	10	Index test, in sufficient detail to allow replication	49
	a		
	10	Reference standard, in sufficient detail to allow replication	49
	b		
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	49
	12	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories	50
	a	of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory	
	12	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories	50
	b	of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory	
	13	Whether clinical information and reference standard results were available	49
	a	to the performers/readers of the index test	
	13	Whether clinical information and index test results were available	50
	b	to the assessors of the reference standard	
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	50
	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled	52
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled	51
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	49
	18	Intended sample size and how it was determined	49
RESULTS			
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram	NA
	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	52
	21	Distribution of severity of disease in those with the target condition	52
	a		

	21 b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition	NA
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	NA
<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard	NA
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	52
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	NA
DISCUSSION			
	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability	55
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	56
OTHER INFORMATION			
	28	Registration number and name of registry	43
	29	Where the full study protocol can be accessed	43
	30	Sources of funding and other support; role of funders	44