

# DIAGNOSE: UM FUTURO CAMPO DE ATUAÇÃO EM MEDICINA

## DIAGNOSIS: A FUTURE FIELD OF MEDICAL ACTIVITY

BRUNO BASILIO DE CASTRO **MOURA**<sup>1</sup>, BERNARDO CARNEIRO DE SOUSA **GUIMARÃES**<sup>1</sup>, FLAVIA GEO **LATORRE**<sup>1</sup>, ISABELLA LIMA **NASCIMENTO**<sup>1</sup>, LETICIA MENDES **FAGUNDES**<sup>1</sup>, LILIANE REGINA DE SOUZA **MORAES**<sup>1</sup>, JOSÉ HELVÉCIO KALIL DE **SOUZA**<sup>2\*</sup>

1. Acadêmico do curso de graduação do curso Medicina da Faculdade de Minas-BH; 2. Médico, Doutor em Reprodução Humana, Coordenador do Núcleo de Saúde da Mulher e Professor Titular de Ginecologia na Faculdade de Minas (FAMINAS-BH).

\* Faculdade de Minas (FAMINASBH) - Avenida Cristiano Machado, 12001, Vila Cloris, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31744007. [jhkalil@gmail.com.br](mailto:jhkalil@gmail.com.br)

Recebido em 14/03/2019. Aceito para publicação em 12/04/2019

### RESUMO

O sequenciamento de última geração (NGS) é um tipo de tecnologia de sequenciamento de DNA que usa o sequenciamento paralelo de múltiplos fragmentos pequenos de DNA. Essa tecnologia permitiu um aumento dramático na velocidade (e uma diminuição no custo) na qual o genoma de um indivíduo pode ser sequenciado. O sequenciamento de Sanger é usado para confirmar a presença de mutações específicas identificadas pela NGS em situações clínicas, devido à maior precisão dos métodos tradicionais de sequenciamento, embora essa prática esteja sendo questionada. A NGS pode ser apropriada para diagnosticar distúrbios genéticos suspeitos quando é improvável que o sequenciamento de um único gene forneça um diagnóstico. Painéis de genes baseados em NGS são usados clinicamente em certas neoplasias hematológicas, e os primeiros testes de painel genético para tumores sólidos. Outras utilizações, como o diagnóstico de infecções e a triagem de pessoas saudáveis continuam sendo investigados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sequenciamento de DNA, sequenciamento de gerações futuras.

### ABSTRACT

Next Generation Sequencing (NGS) is a type of DNA sequencing technology that uses parallel sequencing of multiple small fragments of DNA. This technology has allowed for a dramatic increase in speed (and a decrease in cost) in which an individual's genome can be sequenced. Sanger sequencing is used to confirm the presence of specific mutations identified by NGS in clinical situations due to the greater accuracy of traditional sequencing methods, although this practice is being questioned. NGS may be appropriate to diagnose suspected genetic disorders when single gene sequencing is unlikely to provide a diagnosis. NGS-based gene panels are used clinically in certain hematological malignancies, and the first genetic panel tests for solid tumors. Other uses, such as the diagnosis of infections and the screening of healthy people, continue to be investigated.

**KEYWORDS:** DNA sequencing, sequencing of future generations.

### 1. INTRODUÇÃO

As tecnologias para sequenciamento de DNA evoluíram a ponto de se tornar prático para sequenciar o genoma inteiro de um indivíduo. O sequenciamento de próxima geração (NGS) é um tipo de tecnologia de sequenciamento de DNA que usa o sequenciamento de múltiplos fragmentos pequenos de DNA para determinar uma sequência. Esta tecnologia de "alto rendimento" permitiu um aumento na velocidade e diminuição no custo em que o genoma de um indivíduo pode ser sequenciado. A capacidade de sequenciar um genoma inteiro levanta várias questões desafiadoras para o clínico, incluindo, quando a NGS deve ser considerada clinicamente, qual é a melhor escolha entre vários tipos de testes genéticos disponíveis, qual é o significado clínico dos resultados do sequenciamento de um genoma e quais descobertas devem ser colocadas em prática e / ou encaminhadas ao paciente<sup>1</sup>.

Um grande investimento foi feito para melhorar as tecnologias de sequenciamento de DNA, para torná-las mais baratas, rápidas e eficazes. Os seguintes termos são usados para distinguir metodologias de sequenciamento: Sequenciamento Sanger, sequenciamento de próxima geração (NGS) e sequenciamento de terceira geração.

#### Sequenciamento de Sanger

Sequenciamento Sanger é um sequenciamento manual ou automático usando os métodos desenvolvidos por Sanger, Maxam e Gilbert é considerado a primeira geração de métodos de sequenciamento de DNA. Esses tipos de sequenciamento também são comumente chamados de sequenciamento "convencional" ou "tradicional". O sequenciamento de Sanger determina a sequência de grandes fragmentos de DNA (até aproximadamente 500 a 900 bases), coletando e alinhando uma série de diferentes produtos de comprimento polimerizados ao longo do modelo de DNA. O método original de Sanger usava marcadores radioativos para cada nucleotídeo, e adaptações posteriores usaram versões marcadas com fluorescência<sup>2</sup>. O sequenciamento de Sanger é usado

clínicamente quando a sequência de um gene específico está sendo testada. Como exemplo, o sequenciamento convencional poderia ser usado para identificar uma mutação no fator IX em um paciente com suspeita de hemofilia B, sem examinar o restante do genoma do indivíduo. A sequenciação de Sanger é preferida neste cenário porque mutações no gene que codifica o fator IX já são conhecidas por causar a doença; mutações genéticas podem ser correlacionadas com marcadores laboratoriais da doença (por exemplo, tempo de tromboplastina parcial ativada [TTPA]). Mutações em outros genes são improváveis de causar a hemofilia B. Entretanto, o sequenciamento de Sanger muitas vezes não pode fornecer informações sobre grandes porções do genoma (por exemplo, vários genes) a um custo prático e dentro de um prazo razoável. Uma estimativa previu que o sequenciamento de um genoma humano inteiro usando o sequenciamento de Sanger levaria 60 anos<sup>2</sup>.

### Sequenciamento de próxima geração

O sequenciamento de próxima geração (NGS) utiliza o sequenciamento de múltiplos fragmentos de DNA, realizado em paralelo. Essa tecnologia também é referida por outros termos (por exemplo, sequenciamento de alto rendimento, sequenciamento profundo, sequenciamento de segunda geração). Em contraste com o sequenciamento Sanger, a velocidade de sequenciamento e a quantidade de dados de sequência de DNA gerados com NGS são exponencialmente maiores e são produzidos a custos significativamente reduzidos. Diversas "plataformas" (ou seja, instrumentos de sequenciamento e reagentes associados) para NGS foram desenvolvidas. Nas plataformas NGS, normalmente há uma preparação de amostra ou "preparação de biblioteca" na qual o DNA do paciente, que serve como modelo, é purificado, amplificado e fragmentado, seguido de isolamento físico de fragmentos de DNA por fixação a superfícies sólidas ou pequenas contas. Os dados de sequência são gerados nesses pequenos fragmentos e os resultados eletrônicos são alinhados computacionalmente contra um genoma ou sequência de "referência" (ou seja, um genoma previamente sequenciado designado como referência "normal"). Uma versão atualizada de um genoma de referência humana comumente usada, GRCh38, foi lançada pelo Centro Nacional de Inovação em Biotecnologia (NCBI) em 24 de dezembro de 2013<sup>3</sup>.

### Sequenciamento de terceira geração

O sequenciamento de terceira geração usa um sequenciamento paralelo semelhante ao NGS, mas, ao contrário do NGS, o sequenciamento de terceira geração usa moléculas de DNA isoladas em vez de DNA amplificado como modelo. Assim, o sequenciamento de terceira geração elimina potencialmente os erros na sequência de DNA introduzida no laboratório durante o processo de amplificação do DNA. Os métodos de terceira geração estão em desenvolvimento e não estão ainda clinicamente disponíveis<sup>3</sup>.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho caracteriza-se como um estudo secundário do tipo revisão bibliográfica e refere-se ao futuro campo de atuação em medicina: diagnose.

Como fontes de informações foram utilizados artigos foram consultados os bancos de dados da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Pubmed, Uptodate e Conchrane utilizando os descritores: "Sequenciamento de DNA" e "Sequenciamento de Gerações Futuras". Foram selecionados um total de 20 artigos entre os anos de 2005 a 2018.

## 3. DESENVOLVIMENTO

### Uso clínico de sequenciamento de próxima geração

O NGS nem sempre é o teste genético clínico mais apropriado. É dispendioso, demorado e muitas vezes desnecessário para diagnosticar condições genéticas para as quais a avaliação clínica limitou potenciais candidatos a um ou alguns genes passíveis de sequenciação Sanger ou a outros métodos mais tradicionais de detecção de defeitos genéticos. No entanto, é apropriado considerar o sequenciamento de painéis genéticos de NGS quando um grande número de genes patogênicos precisa ser rastreado<sup>4</sup>. Da mesma forma, o sequenciamento do exoma ou sequenciamento completo do genoma deve ser considerado quando uma condição demonstrar alta herdabilidade em uma família ou suspeita-se que tenha uma base genética, mas o número de potenciais genes candidatos é grande ou genes responsáveis são desconhecidos<sup>5</sup>.

### Indicações para o NGS

Diagnóstico de doenças complexas: A consideração da NGS como uma ferramenta clínica (por exemplo, para diagnóstico genético) é apropriada em indivíduos para os quais é improvável que o sequenciamento de um único gene forneça um diagnóstico. Exemplos incluem suspeitas de distúrbios genéticos nas seguintes configurações: Um dos muitos genes em potencial pode ser responsável, e / ou o clínico não sabe qual gene (s) testar porque muitos genes diferentes causam o mesmo fenótipo (por exemplo, devido à heterogeneidade genética)<sup>6</sup>.

Os genes candidatos óbvios foram testados e foram considerados normais. Isso é especialmente aplicável quando a porcentagem da doença atribuída a esses genes candidatos é baixa, e acredita-se que outros genes potencialmente causadores do distúrbio existam, mas ainda não foram identificados. Tais análises são frequentemente auxiliadas pela comparação dos resultados do NGS de membros da família afetados e não afetados. Seria menos dispendioso e mais eficiente sequenciar todo o genoma, exoma ou painel de genes do que sequenciar sequencialmente genes candidatos individuais<sup>7</sup>.

## Diagnóstico em doenças complexas

### Crianças

Uma das indicações médicas mais comuns para o sequenciamento do genoma completo ou sequenciamento completo do exoma é a avaliação da deficiência intelectual grave ou atraso no desenvolvimento que se acredita ter etiologia genética em uma criança com avaliação inicial negativa. Em alguns casos, a avaliação de uma criança afetada e de ambos os pais ("sequenciamento de trio") é realizada - especialmente quando o padrão de herança é dominante e uma nova mutação é suspeita. O valor da NGS neste cenário foi ilustrado em vários estudos, nos quais a probabilidade de se chegar a um diagnóstico molecular é da ordem de 25%. Portanto, a NGS pode ser apropriada quando uma avaliação extensiva, incluindo o microarranjo cromossômico, for negativa para atraso no desenvolvimento com suspeita de etiologia genética<sup>8,9</sup>.

O sequenciamento do exoma foi realizado para 2000 indivíduos nascidos com déficits neurológicos graves inexplicados por avaliação clínica prévia; pouco menos da metade tinha menos de cinco anos de idade. O diagnóstico molecular foi estabelecido em 504 dos pacientes (25%). O diagnóstico foi mais provável naqueles com achados neurológicos, em vez de anomalias de outros sistemas orgânicos; e a variante genética implicada era mais provável de ser anteriormente não descrita em vez de uma variante conhecida. Quase um terço foi devido a causas genéticas de doenças descobertas nos primeiros dois anos<sup>9</sup>. O sequenciamento do exoma foi realizado em 814 pacientes (metade eram menores de cinco anos de idade) com uma variedade de síndromes inexplicadas, sendo os mais comuns o atraso do desenvolvimento em crianças e a ataxia em adultos. O diagnóstico molecular foi estabelecido em 213 (26%). O diagnóstico foi mais provável em pacientes que tiveram sequenciamento em trio ao invés de sequenciamento sozinho; pacientes com menos de cinco anos de idade; e pacientes com distúrbios da retina (para os quais uma fração maior de genes da doença pode ser conhecida). Foram apresentados exemplos em que a identificação de uma variante anteriormente não associada à doença coincidiu com a publicação de um relato de caso que demonstrasse a associação<sup>8,10</sup>. O sequenciamento genômico completo foi utilizado para avaliar 50 crianças com deficiência intelectual grave que não tiveram diagnóstico após testes genéticos extensos que incluíram sequenciamento do exoma, um diagnóstico genético foi feito em 20 dessas crianças (40%). Essa coorte provavelmente teria sido enriquecida para casos novos, uma vez que nenhuma das crianças apresentava história familiar positiva para deficiência intelectual<sup>11</sup>. Avanços nos métodos e expansão das informações em bancos de dados que podem ser consultados podem melhorar o rendimento do diagnóstico. Isso foi demonstrado em um estudo envolvendo uma coorte de crianças com graves distúrbios do neurodesenvolvimento não diagnosticadas e / ou anomalias congênitas, em que a reanálise dos

dados do sequenciamento quatro anos após a análise inicial identificou defeitos genéticos previamente não reconhecidos em outros 182 indivíduos, elevando o rendimento diagnóstico global de 27 a 40%<sup>12</sup>.

### Adultos

O NGS também está sendo incorporado ao National Institutes of Health (Programa de doenças não diagnosticadas) (UDP), que avalia pacientes que têm uma condição médica de longa data que escapa ao diagnóstico. Em alguns casos, os diagnósticos moleculares podem ter sido desafiadores antes da disponibilidade da NGS se o fenótipo fosse inespecífico (isto é, deficiência intelectual sem distinguir características sindrômicas) em face da grande lista de genes dos candidatos para o sequenciamento tradicional de Sanger. Esta aplicação da NGS foi ilustrada em uma série de 1519 indivíduos com uma variedade de sintomas inexplicáveis (neurológicos, musculoesqueléticos, imunológicos, reumatológicos e outros) que foram encaminhados à Rede de Doenças Não Diagnosticadas (UDN, estabelecida em 2014). Um total de 601 destes foram aceitos para avaliação, incluindo 251 adultos (média de idade das crianças, 8 anos, média da idade dos adultos, 29 anos).

Aproximadamente metade tinha sequenciamento completo do exoma e metade tinha sequenciamento completo do genoma; muitos do último grupo já tinham passado por sequenciamento completo do exoma. Dos 382 indivíduos que completaram sua avaliação no momento da publicação, 132 (35%) receberam um diagnóstico, a maioria com base em seus resultados de sequenciamento. Destes 132, 11 (8%) foram o resultado da reanálise de dados de sequenciamento obtidos anteriormente. A maioria dos diagnósticos foi reconhecida apresentações de uma síndrome conhecida, mas vários foram apresentações incomuns de síndromes conhecidas ou novas síndromes relacionadas a variantes genéticas previamente conhecidas ou anteriormente desconhecidas. Muitos resultaram em mudanças na assistência médica (por exemplo, novos tratamentos, monitoramento revisado, aconselhamento genético).

Este estudo destaca o aspecto da descoberta do sequenciamento do genoma e o valor do sequenciamento em adultos<sup>13</sup>. A NGS também pode ser usada para diagnosticar doenças genéticas se o modo de herança mendeliana for conhecido e amostras familiares também forem sequenciadas para comparação. A disponibilidade clínica da triagem total do exoma aumentou e é uma ferramenta valiosa para tentar acabar com os chamados casos de "odisseia diagnóstica".

### Rastreamento do câncer

Para muitos tipos de câncer, as opções de triagem, testes diagnósticos e terapia incorporam informações genômicas sobre o tumor (alterações somáticas), alterações germinativas em genes cancerígenos hereditários (por exemplo, BRCA1 e BRCA2) e alterações germinativas. Painéis de genes direcionados mostraram uma utilidade expandida em muitos tipos de

câncer, especialmente aqueles para os quais mais de uma variante genética pode ser responsável. Painéis multigênicos para certas síndromes de câncer hereditário baseadas nas recomendações da National Comprehensive Cancer Network (NCCN) estão se tornando opções cada vez mais populares para certos pacientes. Essa abordagem pode ser mais eficiente e econômica, dado o custo decrescente associado à tecnologia NGS e o aumento das indicações para testes genéticos<sup>14</sup>.

Exemplos de painéis genéticos de câncer usados clinicamente para orientar a triagem, opções preventivas e tratamento do câncer incluem os seguintes: Usando um painel genético de câncer que inclua BRCA1 e BRCA2, se houver história pessoal ou familiar de câncer de próstata e/ou pancreático, mesmo na ausência de câncer de mama ou de ovário. Outros genes para os quais variantes patogênicas podem estar associadas ao aumento do risco de câncer de mama incluem ATM, CDH1, CHEK2, NF1, PALB2 e TP53. Rastreamento de causas hereditárias de cânceres gastrointestinais (por exemplo, painéis que incluem APC, BMP1A, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, PTEN, SMAD4, STK11, TP53, BLM, CHEK2, GALNT12, GREM1, POLD1 e / ou PÓLO). Identificação de síndromes familiares de leucemia aguda. Categorização de grupos prognósticos em leucemia mielóide aguda. Pode ser usado também na classificação de certas síndromes hereditárias de insuficiência da medula óssea, análise do tecido tumoral para identificar anormalidades genéticas que podem potencialmente corresponder a terapias direcionadas molecularmente. Como exemplo, um inibidor de poladesesina-difosfato-ribose polimerase (PARP) poderia ser considerado em um paciente com uma mutação identificada de BRCA1 ou BRCA2<sup>14</sup>.

Em 2017, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA aprovou dois testes do painel genético (MSK-IMPACT e FICDx) para analisar as alterações patogênicas em tumores sólidos, esses testes podem ser usados em tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE), independentemente do órgão primário do qual o tumor surgiu. Esses testes detectam variações nas regiões codificadoras de mais de 400 genes e mais de 300 genes, respectivamente, e podem fornecer informações sobre as diferenças entre tecido tumoral e tecido não canceroso adjacente e sobre assinaturas genômicas, como instabilidade de microssatélites e carga mutacional tumoral. As indicações para FICDx incluem câncer metastático e recorrente para vários tipos de tumores sólidos (por exemplo, mama, cólon, endométrio, pulmão, melanoma, pâncreas), bem como outros tumores sólidos e tumores primários desconhecidos<sup>14</sup>.

### Diagnóstico em infecções

Além de diagnosticar distúrbios genéticos, a NGS pode ser útil na identificação de um patógeno infeccioso quando os testes microbiológicos ou sorológicos usuais não são reveladores ou quando um diagnóstico mais

rápido pode melhorar os desfechos. O papel da NGS na identificação de uma infecção foi demonstrado em um relato de caso em que um menino de 14 anos desenvolveu febre inexplicável e meningoencefalite após viajar a Porto Rico. O menino tinha uma síndrome de imunodeficiência subjacente. Uma avaliação extensiva da doença infecciosa não foi reveladora e o estado clínico do paciente piorou. A NGS identificou uma espécie de *Leptospira*, um organismo espirocetico patogênico adquirido pela exposição à água ou solo contaminado, no líquido cefalorraquidiano (LCR) do paciente, mas não no soro. A antibioticoterapia foi iniciada com base nos resultados da NGS, com melhora clínica. Testes subsequentes confirmaram o diagnóstico<sup>15</sup>.

### Indivíduos Saudáveis

A tecnologia NGS está abrindo a porta para a triagem genética e está sendo oferecida também a indivíduos saudáveis, para determinar os riscos de doenças, variantes farmacogenômicas e informações não médicas (por exemplo, ancestralidade). Os laboratórios clínicos começaram a oferecer exames de saúde genéticos nos quais vários genes são sequenciados. O conteúdo desses painéis normalmente inclui amplas versões das condições e genes listados nas recomendações do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG) para o relato de achados secundários no exoma clínico e no sequenciamento do genoma<sup>16</sup>.

Esforços de pesquisa estão em andamento para determinar o valor clínico da triagem de pessoas saudáveis com sequenciamento genômico. Como exemplo, em um estudo de 2017, 100 adultos saudáveis foram aleatoriamente designados para receber um relatório de histórico familiar ou em combinação com um relatório completo de sequenciamento do genoma<sup>17</sup>. Aproximadamente 1 em cada 5 atribuídos ao sequenciamento do genoma foi encontrado para ter um risco monogênico, e aproximadamente 1 em 25 teve um novo diagnóstico clínico. Todos os indivíduos designados para sequenciamento do genoma também receberam achados relacionados ao status da portadora, informações farmacogenômicas relacionadas a cinco drogas e previsões de risco para oito características cardiometabólicas. Os resultados em ambos os braços incluíram novos conselhos do médico para cuidados primários, mudanças nos comportamentos da saúde (tipicamente em dieta ou exercício) e custos financeiros. Os achados demonstram que não são geneticistas podem gerenciar resultados de testes baseados em genômica e desafiam a ideia de que a informação genética é complexa demais para lidar com o nível de atenção primária, o que será importante à medida que a informação genética se torna mais onipresente. Em cuidados médicos e decisões de gerenciamento iniciais ocorrem no cenário da atenção primária<sup>17</sup>.

Os custos associados aos painéis NGS continuam diminuindo, e essa diminuição levou à discussão da triagem universal para avaliar certos fatores de risco, como o risco de câncer hereditário. Como exemplo, a



relação custo-eficácia de tal abordagem usando testes universais BRCA de todas as mulheres com mais de 30 anos foi modelada em uma análise de 2015, que concluiu que se o preço de um teste BRCA caísse abaixo de US \$ 250, isso levaria a um custo de US \$ 53.000 por ano de qualidade de vida (QALY) obtido pela prevenção de câncer de mama, um custo equivalente ao da triagem de rotina de colonoscopia a cada 10 anos, começando aos 50 anos para prevenção do câncer de cólon<sup>18</sup>.

### Limitações

O NGS pode não ter uma precisão quanto outros métodos para detectar tipos específicos de mutações. Por exemplo, a detecção de alterações no número de cópias cromossômicas e / ou grandes ganhos, perdas ou translocações por parte da NGS é problemática devido aos comprimentos curtos de leitura da sequência de DNA. Isso pode resultar em falha na detecção de deleções ou inserções cromossômicas. O sequenciamento tradicional de Sanger compartilha algumas das mesmas limitações, mas, teoricamente, em menor grau com seus comprimentos de leitura mais longos (aproximadamente 1000 bases para o sequenciamento Sanger por aproximadamente 100 a 200 bases para a NGS padrão, embora algumas plataformas relatem comprimentos de leitura mais longos). Esforços de pesquisa para aumentar o comprimento de leitura de sequenciamento em plataformas NGS continuam. Em geral, quando surgem grandes aberrações cromossômicas, plataformas alternativas são geralmente preferidas sobre NGS, como microarray de hibridização genômica comparativa (CGH), amplificação por sonda dependente de multiplex (MLPA), hibridização fluorescente *in situ* (FISH), ou citogenética, com a escolha ideal, muitas vezes dependente da condição clínica específica que está sendo avaliada. Esses métodos alternativos são apresentados separadamente.

Limitações potenciais adicionais, como custo, tempo de resposta longo e preocupações com a falta de reembolso do seguro, estão gradualmente se tornando menos preocupantes à medida que o uso clínico da NGS aumenta<sup>18,19</sup>.

### Discriminações genéticas

Uma preocupação comum sobre o teste genético é o potencial de proteção inadequada da privacidade da informação genética e os impactos associados ao emprego e à cobertura de seguro. Historicamente, os relatórios genômicos individuais fornecidos diretamente das empresas para os consumidores muitas vezes incluíam muitas variantes que provavelmente não seriam clinicamente patogênicas. Como um chip de genotipagem em vez da plataforma NGS era geralmente usado, a maioria das variantes estava localizada em regiões não codificantes do DNA e ocorria em alta frequência na população geral. É improvável que essas variantes tivessem algum valor preditivo significativo. Muitas vezes essas variantes foram relatadas em frequências mais altas do que o risco de doença na vida

observada na população, descontando ainda mais a probabilidade de significância clínica<sup>19</sup>.

### Questões práticas

Onde pedir: As considerações ao selecionar um serviço NGS incluem custo, tempo de resposta, qualidade da interpretação de dados e método de relatório de resultados. Muitos laboratórios universitários e comerciais nos Estados Unidos oferecem o NGS certificado pela Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA). A maior disponibilidade de testes NGS certificados pela CLIA foi estimulada em parte pela contínua redução de custos e pela decisão da Suprema Corte dos Estados Unidos de derrubar algumas das patentes detidas nos testes genéticos BRCA1 e BRCA2. Recursos específicos geralmente estão disponíveis por meio da instituição acadêmica local, mas o acesso direto entre laboratórios de testes comerciais e provedores de serviços de saúde através da utilização de kits de teste pré-embalados é comum. A maioria dos testes clínicos de NGS utiliza painéis de genes direcionados e sequenciamento de exoma. Custo: A barreira de preço continua a cair, particularmente onde a competição entre laboratórios está se intensificando. Painéis de câncer herdados estão disponíveis por menos de US \$ 500 se um paciente escolher uma opção para pagar a empresa diretamente, com antecedência. Há uma mudança contínua em direção a preços mais transparentes e custos diretos dos laboratórios de testes comerciais maiores da NGS<sup>20,21</sup>.

## 4. CONCLUSÃO

O sequenciamento de próxima geração (NGS) é um tipo de tecnologia de sequenciamento de DNA que determina uma sequência do genoma completo do indivíduo. Essa tecnologia permitiu um aumento na velocidade e uma diminuição no custo. O NGS pode ser apropriado para diagnosticar distúrbios genéticos suspeitos e indicações médicas para avaliação de deficiência mental grave ou atraso no desenvolvimento intelectual. Essa tecnologia permite realizar uma análise integrada de um genoma humano dentro de um contexto clínico. Desse modo, o NGS ainda se apresenta como uma tecnologia de sequenciamento complexa que se faz necessário maiores investigações com elevados índices de evidências no intuito de esclarecer suas implicações dentro da prática médica.

## REFERÊNCIAS

- [1] Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5:887.
- [2] Bennett ST, Barnes C, Cox A, et al. Toward the 1,000 dollars human genome. *Pharmacogenomics* 2005; 6:373.
- [3] Hong YC, Liu HM, Chen PS, et al. Hair follicle: a reliable source of recipient origin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40:871.

- [4] Adams DR, Eng CM. Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *N Engl J Med* 2018; 379:1353.
- [5] Lee H, Deignan JL, Dorrani N, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA* 2014; 312:1880.
- [6] Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet* 2015; 385:1305.
- [7] Yang Y, Muzny DM, Reid JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 2013; 369:1502.
- [8] Yang Y, Muzny DM, Xia F, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA* 2014; 312:1870.
- [9] Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 2014; 511:344.
- [10] Wright CF, McRae JF, Clayton S, et al. Making new genetic diagnoses with old data: iterative reanalysis and reporting from genome-wide data in 1,133 families with developmental disorders. *Genet Med* 2018.
- [11] Tarailo-Graovac M, Shyr C, Ross CJ, et al. Exome Sequencing and the Management of Neurometabolic Disorders. *N Engl J Med* 2016; 374:2246.
- [12] Kuehn BM. NIH's Undiagnosed Diseases Program expands: 6 new sites offer potential answers to more patients. *JAMA* 2014; 312:587.
- [13] Splinter K, Adams DR, Bacino CA, et al. Effect of Genetic Diagnosis on Patients with Previously Undiagnosed Disease. *N Engl J Med* 2018.
- [14] Lazaridis KN, Schahl KA, Cousin MA, et al. Outcome of Whole Exome Sequencing for Diagnostic Odyssey Cases of an Individualized Medicine Clinic: The Mayo Clinic Experience. *Mayo Clin Proc* 2016; 91:297.
- [15] <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm585347.htm> (Accessed on November 16, 2017) Tábua completa de mortalidade para o Brasil, 2016. Breve análise da evolução da mortalidade no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2018. [acesso 30 mar. 2018] Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>
- [16] Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. *N Engl J Med* 2014; 370:2408.
- [17] Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2017; 19:249.
- [18] Long EF, Ganz PA. Cost-effectiveness of Universal BRCA1/2 Screening: Evidence-Based Decision Making. *JAMA Oncol* 2015; 1:1217.
- [19] Manchanda R, Patel S, Gordeev VS, et al. Cost-effectiveness of Population-Based BRCA1, BRCA2, RAD51C, RAD51D, BRIP1, PALB2 Mutation Testing in Unselected General Population Women. *J Natl Cancer Inst* 2018; 110:714.
- [20] Waddell N, Pajic M, Patch AM, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015; 518:495.
- [21] Goldfeder RL, Wall DP, Khoury MJ, et al. Human Genome Sequencing at the Population Scale: A Primer on High-Throughput DNA Sequencing and Analysis. *Am J Epidemiol* 2017; 186:1000.