

Validação de uma metodologia de sequenciamento de cDNA como ferramenta complementar no diagnóstico molecular do complexo da esclerose tuberosa

Clévia Rosset^{1,2}, Maria Clara de Freitas Pinho¹, Patricia Santos da Silva¹, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,3,4}, Arthur Bandeira de Mello Garcia^{1,3}.

¹Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciência Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

⁴Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

Introdução/Fundamentos: A maioria dos testes genéticos em pacientes com complexo da esclerose tuberosa (TSC) é realizada por sequenciamento de nova geração (NGS) em amostras de DNA, e abrange regiões codificantes e pequenas porções dos introns dos genes *TSC1* e *TSC2*. Com esta estratégia, 3-7% dos pacientes apresentam variantes de significado incerto (VUS) e 10-15% não apresentam variantes, o que prejudica o seu acompanhamento adequado. **Objetivo:** Validar uma metodologia complementar ao sequenciamento de nova geração para identificar variantes nos pacientes com resultado negativo ou verificar o papel das VUS. **Delineamento e Métodos:** Estudo prospectivo experimental. Foram recrutados três indivíduos com VUS e um com resultado negativo de NGS, todos com suspeita clínica de TSC. Um tubo de sangue total foi coletado de cada indivíduo para separação de leucócitos, os quais foram cultivados, expandidos e tratados com puromicina. Após, foi realizada a extração de RNA total e conversão para DNA codificante (cDNA). Como o cDNA não possui introns, diferente do DNA, foram desenhados *primers* específicos para amplificar os exons dos genes *TSC1* e *TSC2* em blocos. O tamanho dos amplicons foi verificado em eletroforese em gel de agarose 2% por 2 horas. As bandas com tamanho diferente do esperado foram purificadas e sequenciadas pelo método de Sanger. Um cDNA comercial sem alterações foi utilizado como controle. **Resultados:** Em um dos indivíduos, a VUS c.664-10T>C em *TSC1* foi detectada previamente por NGS. A metodologia de cDNA revelou a inclusão de nove pares de base do intron 7 no RNA mensageiro de *TSC1* deste indivíduo, levando à produção de uma proteína truncada. Cinco familiares deste paciente foram analisados: um familiar com suspeita clínica de TSC também apresentou a variante e a alteração em cDNA; os demais familiares não possuem manifestações clínicas de TSC, e não apresentaram a variante e alterações de cDNA. Não foram detectadas alterações no cDNA controle. **Conclusões/Considerações finais:** A metodologia proposta pode ser utilizada para a detecção de alterações no processamento de RNA mensageiro em amostras de cDNA. As análises de cDNA e de segregação permitiram a reclassificação da variante c.664-10T>C para patogênica. Esta variante foi identificada pela primeira vez na população gaúcha, mas ainda não tinha papel identificado. O método também foi validado com amostras controle e possui custo baixo, tendo potencial importante no diagnóstico molecular de doenças raras.