



PLANO DE TRABALHO		Área: AIN3
Edital Doenças Raras		Depto: DSAQ
FFM - FFM - 803340	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340

A.1. DADOS CADASTRAIS

A.1.1. PROPONENTE

A.1.1.1. Instituição

Razão Social: FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA		Sigla: FFM
Nome Fantasia:		
CNPJ Próprio	Códigos do SIAFI	
Nº: 56.577.059/0001-00	UG Nº: 0	Gestão Nº: 0

Endereço: AVENIDA REBOUÇAS, Nº 381		Bairro: JARDIM PAULISTA	
Cidade: SÃO PAULO	UF: SP	CEP: 05401-000	Caixa Postal:
Telefone: 1130164948, 1130164949		Fax:	
Email: FFM@FFM.BR		URL: WWW.FFM.BR	

Natureza Jurídica: 306-9 FUNDAÇÃO PRIVADA	
Atividade Econômica Predominante: 80.30-6 Educação superior	
Nº Empregados/Funcionários:	Receita anual: 1.255.683.000,00

A.1.1.2. Dirigente

Nome: ARNALDO HOSSEPIAN SALLES LIMA JUNIOR		Cargo: DIRETOR PRESIDENTE
CPF: 013.168.298-98	RG: 114200440	Orgão Expedidor:

Endereço Residencial: AVENIDA REBOUÇAS, Nº 381		Bairro: JARDIM PAULISTA	
Cidade: SÃO PAULO	UF: SP	CEP: 05401-000	Email: HOSSEPIANJR@FFM.BR
Telefone: 1130164948		Fax:	

PLANO DE TRABALHO		Área: AIN3
Edital Doenças Raras		Depto: DSAQ
FFM - FFM - 803340	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340

A.1. DADOS CADASTRAIS

A.1.2. EXECUTOR

A.1.2.1. Instituição

Razão Social: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO		Sigla: HCFMUSP
Nome Fantasia:		
CNPJ Próprio	Códigos do SIAFI	
Nº: 60.448.040/0001-22	UG Nº: 0	Gestão Nº: 0

Endereço: AVENIDA DR. ENEAS DE CARVALHO AGUIAR, Nº 255		Bairro: CERQUEIRA CESAR	
Cidade: SÃO PAULO	UF: SP	CEP: 05403-000	Caixa Postal:
Telefone: 1126617704, 1126616200		Fax:	
Email: CONVENIOS.PUBLICOS@HC.FM.USP.BR		URL: HC.FM.USP.BR	

Natureza Jurídica: 111-2 AUTARQUIA ESTADUAL OU DO DISTRITO FEDERAL	
Atividade Econômica Predominante: 85.11-1 Atividades de atendimento hospitalar	
Nº Empregados/Funcionários:	Receita anual: 2.600.000.000,00

A.1.2.2. Dirigente

Nome: Antonio José Rodrigues Pereira		Cargo: SUPERINTENDENTE
CPF: 106.527.498-01	RG: 11.813.671	Orgão Expedidor: SSP-SP

Endereço Residencial: Rua Dr. Ovídeo Pires de Campos, 225 - 5º andar		Bairro: Cerqueira César	
Cidade: SÃO PAULO	UF: SP	CEP: 05403-010	Email: antonio.pereira@hc.fm.usp.br
Telefone: 1126616200, 1130618798, 1126617704		Fax:	

A.1.2.3. Coordenador

Nome: MAGDA MARIA SALES CARNEIRO SAMPAIO		Cargo: Presidente do Conselho Diretor do Instituto da Criança e do Adolescente do HCFMUSP
CPF: 807.759.858-72	RG: 10883690	Orgão Expedidor: SSP - SP

Endereço Residencial: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 647		Bairro: CERQUEIRA CESAR	
Cidade: SÃO PAULO	UF: SP	CEP: 05403-900	Email: magdasc@usp.br
Telefone: 1126618803		Fax:	

PLANO DE TRABALHO		Área: AIN3
Edital Doenças Raras		Depto: DSAQ
FFM - FFM - 803340	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340

A.3. DADOS DO PROJETO

A.3.1. DESCRIÇÃO DO PROJETO

Título do Projeto: ABORDAGEM INTEGRADA NO DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS GENÉTICAS RARAS: DAS MULTIÔMICAS A PREVENÇÃO	Sigla: DORA - BR
Prazo Execução: 36 Meses	

Objetivo Geral (Objeto da Proposta):

- a) Avaliação do incremento na taxa de diagnóstico molecular com o emprego integrado de diferentes análises genômicas;
b) Estimativa de prevalência de doenças genéticas raras de herança recessiva a partir de dados genômicos disponíveis na população brasileira visando estabelecer estratégias de triagem de heterozigotos para prevenção de novos casos.
c) Aconselhamento genético não diretivo, com orientações sobre o seguimento, manejo clínico-terapêutico do indivíduo, risco de recorrência na família e opções relacionadas ao futuro reprodutivo do casal em questão, com possibilidade da realização do diagnóstico pré-implantacional por seleção de embriões para casais selecionados

Metas Físicas:

- 1 - Etapa de sequenciamento genético e análises (metiloma/transcriptoma)
- 2 - Estudo em fertilização in vitro
- 3 - Tratamento final dos dados
- 4 - Divulgação científica dos resultados

Justificativa Resumida:

Área Geográfica de Execução:

região Sudeste - Brasil todos os Estados do Brasil

Resumo da Equipe Executora:

O projeto será coordenado por Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio? NIVEL?1A do CNPq e prof titular de Pediatria. Dedicar-se à área da Imunologia aplicada à Pediatria, tendo fundado em 1978 a Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança e do Adolescente (ICr), onde foram identificados no Brasil os primeiros casos de Imunodeficiências Primárias e de AIDS pediátrica. Como presidente do Conselho Diretor do (ICr) do HCFMUSP e responsável pelo programa de Doenças Raras do HCFMUSP irá coordenar as atividades dos grupos clínicos do HCFMUSP e a interação com os grupos de diagnóstico molecular do Instituto de Biociências (IBUSP).

As áreas clínicas do HCFMUSP contarão com os seguintes pesquisadores:

Endocrinologia

Berenice Bilharinho de Mendonça, Nível Sr do CNPq, Prof Titular de Endocrinologia, responsável pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, LIM/42 e dos Laboratórios Multiusuários LCMS cromatografia/espectrometria de massa e de Sequenciamento em larga escala. Sua produção científica está no top 0,1% dos acadêmicos que escreveram sobre Distúrbios do Desenvolvimento Sexual, um nível rotulado como "Especialista Mundial.

Ana Claudia Latrônico Xavier, Nível 1A do CNPq e Prof titular em Endocrinologia da FMUSP, Pesquisadora Principal do LIM/42 do HCFMUSP, ganhadora do Prêmio Richard E. Weitzman Memorial Award (2003) e do Prêmio International of Excellence in Endocrinology (2019), ambos concedidos pela Sociedade Americana de Endocrinologia.

Alexander Augusto de Lima Jorge- NIVEL 1A do CNPq Prof Associado de Endocrinologia da FMUSP, responsável pela Unidade de Endocrinologia-Genética (LIM25) e pesquisador do LIM42. Responsável pelos ambulatórios do HCFMUSP para atendimento de pacientes com distúrbio de crescimento e doenças genéticas em endocrinologia. Prêmio César Bergadá Lecture pela destacada contribuição para a Endocrinologia Pediátrica.

Renata Scalco ? pós doutora em Ciências pela FMUSP (2019). Pesquisadora do LIM 25.

Pediatria / Genética Médica

Chong Kim?NIVEL 1C do CNPq Livre Docência em Genética Médica pelo Depto. Pediatria na FMUSP, chefe da Unidade de Genética do ICr e supervisora do programa em Genética Médica.

Débora Bertola ? NIVEL 2 do CNPq Médica Assistente na Unidade de Genética do ICr. Experiência na área de Medicina, com ênfase em Genética Clínica, atuando anormalidades múltiplas/genéticas.

Guilherme Yamamoto - médico da Unidade de Genética Clínica do ICr, coordenador de bioinformática do CEGH-CEL, head de inovação genômica e bioinformática do laboratório GeneOne da DASA.

Fernanda Bertonha pesquisadora do Depto de Pediatria da FMUSP, onde atua no Laboratório de Genômica Pediátrica. Pesquisa genômica funcional e redes transcricionais.

Werther Brunow de Carvalho ? Prof. Titular Terapia Intensiva - Neonatologia, Especialista em Terapia Intensiva e Neonatologia, em Nutrição Parenteral e Enteral.

Silvia Takaraha pesquisadora do ICr , no Laboratório de Genômica Pediátrica e multiusuário de sequenciamento de DNA.

Andreia Cristiane Rangel-Santos responsável por diagnóstico molecular de imunodeficiências primárias no LIM36-ICr, e pesquisadora em projetos em genética e biologia molecular de DR.

Neurologia

Fernando Kok ? prof. associado de Neurologia Infantil da FMUSP. Formação em Neurologia Infantil, Neurogenética e Medicina Laboratorial. Pesquisador Associado do CEGH-CEL.

Ginecologia

Edmund Chada Baracat) ? nível 1A ? Prof. titular de ginecologia da FMUSP, membro titular do Conselho Deliberativo do HCFMUSP, experiência na área de Medicina, com ênfase em Ginecologia e Obstetrícia, atuando principalmente em saúde reprodutiva.

Pedro Augusto Monteleone Doutor em ginecologia pela FMUSP. Diretor Técnico e Científico do Centro de Reprodução Humana Mario Covas do HCFMUSP e membro da câmara técnica de reprodução humana do CREMESP

Patologia Clínica

CEGH-CEL

Maria Rita Passos-Bueno- Nível 1 A ? Profa. Titular de Genética do IBUSP. Tem experiência na área de Genética Humana e Genômica Molecular, coordena o laboratório de Diagnóstico Molecular de Doenças do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL)

Mayana Zatz ? NÍVEL 1 A - Profa. Titular de Genética do IBUSP Coord. CEPID/FAPESP CEGH-CEL e do INCT :Envelhecimento e doenças genéticas: genômica e metagenômica. Recebeu a ordem nacional de grã-cruz de mérito científico. Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Genética Humana e Médica, atuando em biologia molecular com enfoque em doenças neuromusculares.

Mariz Vainzof ? NÍVEL 1D- , Profa Titular de Genética do IBUSP, coordenadora do Laboratório de Proteínas musculares e Histopatologia Comparada, do CEGH-CEL.

Ana Cristina Krepischi - NÍVEL 2 - Profa do Depto de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP

Michel Naslavsky Profa do Depto de Genética e Biologia Evolutiva do IB USP, pesquisa no CEGH-CEL e no Lab de Big Data Analytics do HIAE.

Regina Célia Mingroni Netto ? nível 2- docente do Depto. de Genética e Biologia Evolutiva do IB-USP, coord programa de Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

Consultor

João Bosco de Oliveira Filho Gerente Médico do Lab, Genética Molecular (NGS, HLA e Citogenética) Investigador principal do Projeto PROADI Genomas Raros. Pesquisa Imunologia e Genética, principalmente no estudo das imunodeficiências primárias e outras doenças raras.

Para a realização das atividades do projeto serão incorporados 5 Bolsistas em nível de pós-doutorado: Bolsista 1: organização das amostras de DNA e RNA coletadas no HCFMUSP. Bolsista 2: organização das amostras de DNA e RNA coletadas no CEGH-CEL, análises ômicas, preparação de amostras para sequenciamento de RNA e metiloma, análise genômica junto com os bolsistas de bioinformática e com bolsista 1. Bolsista 3: análise de exomas e genomas. Bolsista 4: análise de transcriptoma e metiloma. Bolsista 5 : Ficará responsável pela seleção dos casais para realização de fertilização in vitro, preparo da paciente até a assistência pré-natal.

Resumo do Orçamento:

? Bolsas para alunos ? pós-doutorado: Serão 5 bolsas de 35 meses (no valor de equivalência a bolsa de pós-doutorado júnior do CNPq (R\$ 4.100 por mês; total do projeto R\$717.500,00).

Bolsista 1: Ficará responsável pela organização das amostras de DNA e RNA coletadas pelos pesquisadores da FMUSP. Participará da análise genômica junto com os bolsistas de bioinformática. Este bolsista ficará alocado nos laboratórios dos pesquisadores da FMUSP, sob responsabilidade de de Dr. Alexandre A. L. Jorge, Dra. Debora Bertola, Dra. Magda Carneiro-Sampaio e fará a interlocução entre os pesquisadores da FMUSP com o CEGH-CEL e desenvolverá o trabalho alinhado com bolsista 2.

Bolsista 2: Ficará responsável pela organização das amostras de DNA e RNA coletadas no CEGH-CEL para análises ômicas. Participará da preparação destas amostras para sequenciamento de RNA e metiloma . Participará da análise genômica junto com os bolsistas de bioinformática e com bolsista 1. Este bolsista desenvolverá o trabalho alinhado com bolsista 1. Fará a interlocução entre os pesquisadores da FMUSP e do CEGH-CEL. Este bolsista ficará sob a responsabilidade de Dra. Debora Bertola, Dra. Maria Rita Passos-Bueno e Dra. Mayana Zatz.

Bolsista 3: Ficará responsável pela análise de exomas e genomas realizadas no projeto. Trabalhará de forma integrada com os outros bolsistas da área da saúde. Ficará sob responsabilidade de Dr. Alexandre Jorge e Dra. Debora Bertola

Bolsista 4: Ficará responsável pela análise de transcriptoma e metiloma realizadas no projeto. Trabalhará de forma integrada com os outros bolsistas da área da saúde. Ficará sob responsabilidade de Dra. Maria Rita Passos-Bueno e Dra. Mayana Zatz.

Bolsista 5 : Ficará responsável pela seleção dos casais para realização de fertilização in vitro, com diagnóstico embrionário pré-implantacional, monitoramento das amostras obtidas até sua análise final. Além disso, cuidará do preparo da paciente desde o início do tratamento até o encaminhamento para a assistência pré-natal sob responsabilidade de Dr. Edmund Baracat e Dr. Pedro Monteleone. Justificativa, devido à complexidade dos projetos e prazo máximo de 3 anos para a realização dos objetivos propostos, é imprescindível haver o envolvimento de pesquisadores já com experiência nas áreas de técnicas de genética molecular, análise de sequenciamento completo do exoma/genoma, estudo funcional, avaliação clínica de doenças complexas e estruturação-análise de banco de dados genômicos.

? Sequenciamento completo do genoma ? serão realizados análise de 50 probandos e seus progenitores (trios) totalizando 150 amostras a serem sequenciadas. O custo por genoma é atualmente de R\$ 4.000,00 por amostra o que inclui os reagentes necessários, mão de obra especializada e uso de aparelhos para extração do DNA, preparo das bibliotecas, realização das sequências propriamente ditas e análise de bioinformática inicial (alinhamento, chamada das variantes e análise de alterações estruturais). Desta forma os arquivos necessários para análise das variantes causais (BAM, BAI, VCF) serão entregue aos pesquisadores proceder o estudo proposto. Valor total destinado R\$ 600.000,00.

Justificativa: Etapa essencial para buscar a elucidação da etiologia genética de casos já amplamente investigados e sem solução. A metodologia está no centro do objetivo do projeto que visa identificar novas síndromes genéticas ou mecanismos de doenças genéticas.

? Procedimentos de metiloma global ? reagentes, mão de obra especializada e uso de aparelhos para proceder análise de metiloma global. R\$ 2.000,00 por amostra, projetado o uso da análise de 20 casos, 20 casos controles negativos e 20 casos controles positivos (pacientes com variantes genéticas já associados a alterações no perfil de metilação), totalizando R\$ 120.000,00.

? Justificativa: Técnica que será usada de forma complementar ao sequenciamento completo do genoma; esta estratégia poderá dar suporte e melhor caracterização de novos mecanismos de doença ou novas síndromes genéticas .

? Procedimentos de transcriptoma (RNAseq) ? reagentes, mão de obra especializada e uso de aparelhos para proceder análise de transcriptoma. R\$ 2.000,00 por amostra, projetado o uso da análise de 20 casos, totalizando R\$ 40.000,00

? Justificativa: Abordagem que será usada de forma integrada ao sequenciamento completo do genoma e pode dar suporte e melhor caracterização de novos mecanismos de doença ou novas síndromes genéticas.

? Diagnóstico Genético Pré-Implantacional. No estudo atual é pretendido realizar a seleção de 5 casais sob risco de terem filhos com doenças genéticas raras com base molecular já caracterizada para receberem suporte para fertilização in vitro com diagnóstico genético pré-implantacional relacionado a doença monogênica associada. O custo por casal relaciona-se a etapas de seleção, estimulação da ovulação, captação de óvulos, fertilização in vitro, seleção de embriões não afetados para transferência para o útero materno e acompanhamento pós-implantacional, gestação e parto. O custo de todo processo é de R\$ 24.000,00 por casal/gestação, totalizado um gasto de ocorrência de R\$ 120.000,00, insumos ginecos na ordem de R\$ 14.000,00, e Medicamentos indução ovulação FIV/ICSI Gineco na ordem de R\$ 17.000,00

? Justificativa: Trata-se de uma prova de conceito que a metodologia seria viável para promover gestações seguras e livres de doenças identificadas no núcleo familiar. O desenvolvimento desta técnica e formação de pessoas é um dos eixos relacionados ao desenvolvimento de estratégias para prevenção de doenças raras.

? Técnicas de genética-molecular tradicional. Neste item do orçamento inclui técnicas complementares como sequenciamento tipo Sanger, real-time PCR, análise de cromossomos por array, sequenciamento completo do exoma (WES), MLPA, MS-MLPA, entre outros. O

orçamento visa a cobrir a compra de reagentes, material de laboratório necessários para o desenvolvimento destas técnicas. valor solicitado (R\$ 120.000,00) para realização do projeto seja destinado a estas técnicas.

Justificativa: A análise de genoma, transcriptoma e metiloma frequentemente precisam ser complementadas e analisadas em outros membros da família para proceder confirmação dos achados ou melhor caracterização da alteração genética entre os indivíduos envolvidos na análise. Além disso, estudos de familiares permitem identificar indivíduos assintomáticos portadores da mesma mutação patogênica do probando, o que abre novos caminhos para terapias.

? Uso de data center e plataforma para realização das análises de bioinformática: Compreende uso de espaço de armazenamento de dados genômicos, processamento nas nuvens com uso de programas específicos para os estudos propostos (análise do genoma e criação de um banco de dados de variantes genéticas). Aproximadamente 7% da verba solicitada será destinada para este fim, cerca de R\$ 150.000,00.

Justificativa: há necessidade de armazenamento e processamento computacional de grande montante para análise de genoma além da formação do banco de dados para análise das variantes deletérias em heterozigose em genes causadores de doenças recessivas.

? Custo administrativo ? Fundação Faculdade de Medicina. O valor estipulado para administração de recursos é de 5% total do valor solicitado.

Justificativa: Liberação de bolsas, gerenciamento dos recursos financeiros, compra de reagentes e contratos de serviços de terceiros

Linha Temática:

Linha Temática 1 - Rastreamento, diagnóstico e marcadores prognósticos de Doença Rara (DR)

Subtema:

Novos métodos para rastreamento neonatal e diagnóstico de DR para atualização das tecnologias implementadas no SUS

Descrição do Projeto:

As doenças raras constituem um grupo amplo e heterogêneo de doenças com prevalência inferior a 1:2000 nascimentos, sendo que a maioria delas (80%) apresenta etiologia genética e acomete a população pediátrica. Embora individualmente raras, em conjunto são responsáveis por parcela considerável das internações hospitalares e por aproximadamente 1/3 das causas de óbitos no primeiro ano de vida¹. Dentre as causas etiológicas clássicas associadas às doenças genéticas, destacam-se aquelas decorrentes de alterações no número de cópias (CNVs) de segmentos cromossômicos (as microdeleções/microduplicações) e de variantes causais em um único gene (denominadas doenças mendelianas). No catálogo de doenças mendelianas (Online Mendelian Inheritance in Man ? OMIM) são listados mais de 6.000 fenótipos com base molecular conhecida (<https://www.omim.org/statistics/entry>). Embora não haja dados epidemiológicos no Brasil, nos Estados Unidos estima-se que 25 milhões de pessoas apresentem uma doença mendeliana, com alta morbidade e mortalidade, acarretando alto impacto econômico nos serviços de saúde, tanto na população pediátrica, como na adulta. Um grande avanço na identificação das bases moleculares dessas doenças foi alcançado na última década a partir do emprego do sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês next-generation sequencing), técnica que permite o sequenciamento em larga escala do material genético do indivíduo. O conhecimento das bases moleculares dessas doenças é o passo inicial para um maior entendimento da condição em questão, o que pode proporcionar um seguimento médico mais adequado, o aconselhamento genético preciso para o paciente e para seus familiares, assim como abrir caminho para tratamento efetivo e personalizado no futuro. Além disso, o conhecimento dos processos biológicos característicos de uma doença rara pode auxiliar no entendimento de como os genes/proteínas interagem para a formação do organismo saudável ou ainda ser aplicado à compreensão das doenças comuns².

No entanto, mesmo com o emprego de técnicas de grande abrangência no estudo das sequências codificadoras do genoma humano, como o sequenciamento do exoma, a positividade deste teste varia entre 10% e 50%, a depender do grupo de doenças considerado. O diagnóstico molecular inconclusivo decorre, não somente de questões clínicas, como também metodológicas, uma vez que a técnica empregada pode apresentar restrições quanto à cobertura da região onde está contida a alteração (regiões intrônicas/intergênicas), limitações nas análises de CNVs, de outras alterações estruturais e mutações do tipo dinâmicas, além de não detectar alterações epigenéticas. Soma-se a isso o fato de haver pelo menos 1.500 fenótipos/locos descritos no catálogo do OMIM cuja base molecular ainda não foi elucidada. Diante disso, embora a maior parte das variantes associadas a fenótipos mendelianos sejam substituições de nucleotídeos ou pequenas indels (<50pb), situadas em regiões codificadoras (e, portanto, passíveis de detecção no sequenciamento do exoma), outras técnicas estão sendo estrategicamente aplicadas para a investigação complementar de casos inconclusivos ou negativos, incluindo, entre outras, o sequenciamento completo do genoma, sequenciamento do transcriptoma (RNAseq), sequenciamento de moléculas de DNA longas e análise dos padrões de metilação do DNA^{3,4,5}.

Outra ferramenta fundamental para a identificação de doenças raras é a triagem neonatal por meio de exames bioquímicos, utilizada como política pública para a identificação precoce de indivíduos assintomáticos para diferentes doenças, com o objetivo de proporcionar um manejo clínico-terapêutico adequado, em tempo hábil. Os avanços tecnológicos têm permitido expandir o número de doenças raras incluídas, tanto na triagem neonatal, como na triagem de heterozigotos (indivíduos portadores de variantes em um alelo do gene associado a doenças recessivas). Embora os critérios estabelecidos em 1968 fossem direcionados à triagem neonatal, posteriormente a triagem de heterozigotos também foi incluída, com o objetivo de identificar casais em risco de terem uma criança acometida por uma doença genética com padrão de herança recessivo⁶. Cumpre ressaltar que a triagem de heterozigotos por testes bioquímicos tem ainda várias limitações. Estima-se que haja mais de 1800 doenças recessivas, com 1:100 casais nesta situação, a grande maioria sem sinais e/ou sintomas. O risco de doenças recessivas é ainda maior em populações com maior grau de consanguinidade, isolados geográficos e ancestralidade comum mais recentemente, os testes genômicos passaram a ser incorporados à triagem neonatal e de heterozigotos, permitindo um salto qualitativo na identificação de alterações deletérias, trazendo ampla discussão sobre os genes a serem incluídos em tais programas. Neste contexto, a priorização de doenças alvos para esta análise deve-se basear na frequência de alelos patogênicos presentes na população. Nas doenças recessivas, aqueles indivíduos que carregam apenas uma cópia do alelo com a variante não apresentam manifestação da doença, o que também ocorre com mulheres em doenças recessivas ligadas ao cromossomo X. Baseado no princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sabendo-se a frequência do alelo em heterozigose é possível estimar a ocorrência de indivíduos que manifestarão a doença (portadores de variantes patogênicas em homozigose, hemizigose ou heterozigose composta). A determinação da probabilidade de ocorrência de doenças genéticas recessivas baseada na frequência de alelos patogênicos na população geral permite elaborar políticas de rastreamento neonatal por meio do oferecimento de painel de genes alvos, reduzindo o tempo para identificação dos pacientes afetados e estabelecimento de condutas apropriadas, além de definir as doenças recessivas mais prevalentes no país. Adicionalmente, permite prover aconselhamento genético preciso para casais com filhos afetados. Em nosso país já foram caracterizados diversos grupos populacionais (<https://www.inagemp.bio.br/ceniso/>) com maior risco para ocorrência de doenças recessivas específicas. Os primeiros programas de triagem de portadores foram implementados para doenças graves em populações específicas, como a doença de Tay-Sachs na população de judeus Ashkenazi, sendo posteriormente ampliados em vários países, respeitando a autonomia reprodutiva do casal e incluindo informações, entre outras, sobre diagnóstico genético pré-implantacional. (PGT)⁶. O PGT é um teste útil para determinar a presença de anormalidades genéticas no DNA de oócitos ou embriões. Dentre as técnicas empregadas, há uma direcionada à identificação de variantes em genes únicos (PGT-M). Este teste é utilizado em conjunto com técnicas de fertilização in vitro (IVF) e os embriões desenvolvidos em laboratório (mais comumente em estágio de blastocisto) são submetidos a biópsia e enviados para análise genética. Os embriões afetados não são transferidos para o útero materno. Assim, o PGT-M possibilita que casais portadores de uma doença genética mendeliana ou que compartilhem variantes no mesmo gene sob risco de uma doença genética grave em sua prole, evitem transmitir essa condição a seus descendentes, se essa for a opção de escolha após

aconselhamento genético adequado. O presente projeto tem como objetivo investigar indivíduos com doenças raras de etiologia genética em seguimento em ambulatórios especializados com ampla experiência nas áreas de Genética Médica, Imunologia e Endocrinologia, na população pediátrica, e na área de Reprodução em casais em risco de descendentes com alguma dessas doenças raras de etiologia genética. Para tanto, estudos genômicos serão conduzidos em indivíduos selecionados, incluindo diferentes abordagens ômicas direcionadas às bases etiológicas das doenças, como o sequenciamento do exoma (como primeira linha na investigação), seguida, nos casos inconclusivos/negativos, do sequenciamento do genoma, transcriptoma ou metiloma. As diferentes técnicas empregadas visam a obter maior positividade na elucidação diagnóstica desses indivíduos, minimizando o impacto do longo período que normalmente ocorre até o estabelecimento do diagnóstico. Os genitores de indivíduos com diagnósticos de doenças recessivas serão orientados sobre o diagnóstico, prognóstico, terapias e risco de recorrência e, caso seja da vontade do casal, poderão ser encaminhados ao Centro de Reprodução Humana para avaliar a possibilidade da realização de fertilização in vitro e seleção de embriões por diagnóstico pré-implantacional. Com o objetivo de prover uma avaliação mais global da frequência de heterozigotos em genes reconhecidamente associados a doenças mendelianas recessivas na população brasileira, será analisada uma amostra de pelo menos 5.000 exomas/genomas, obtida em estudos genômicos já previamente realizados pelos diferentes centros deste projeto. Pretende-se obter as frequências alélicas de diferentes doenças, permitindo estabelecer aquelas mais prevalentes na população brasileira, com impacto em políticas públicas específicas que poderão ser implementadas a partir deste conhecimento.

Referências:

1. Wright CF, et al. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. Nat Rev Genet. 2018.
2. Chong JX et al. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. Am J Hum Genet. 2015 Aug 6;97(2):199-215.
3. De Coster W, et al. Towards population-scale long-read sequencing. Nat Rev Genet. 2021 Sep;22(9):572-587.
4. Paparella A, et al. Genome-wide DNA methylation profiling and exome sequencing resolved a long-time misdiagnosed case. J Hum Genet. 2022 May 18.
5. Peymani F, et al. RNA sequencing role and application in clinical diagnostic. Pediatr Investig. 2022 Mar 5;6(1):29-35.
6. Cornet MC, et al. Neonatal and carrier screening for rare diseases: how innovation challenges screening criteria worldwide. J Community Genet. 2021 Apr;12(2):257-265.

Resumo publicável:

O diagnóstico precoce das doenças raras (DR) pediátricas é fundamental para tratamentos adequados, aconselhamento genético e prevenção de novos casos. Mesmo com os recentes avanços na dissecação da arquitetura genômica, o sucesso dos testes genômicos está aquém do ideal, pois soluciona o diagnóstico em 10-50% dos casos. Nosso projeto tem como um dos objetivos principais investir em análises integradas multi-ômicas (genoma completo, metiloma, transcriptoma) para identificar novos genes e mecanismos moleculares em DR. No Brasil, os dados epidemiológicos quanto à prevalência de DR são escassos, e assim o segundo objetivo de nossa proposta é validar o nosso modelo de estimativa genômica da prevalência de DR de herança recessiva na população brasileira em uma casuística com mais de 5.000 exomas já efetuados. Esse conhecimento é fundamental para estabelecer estratégias de triagem neonatal e prevenção de novos casos. Por fim, iremos implantar ações que visem à prevenção de DR em sistemas aplicáveis no SUS através da seleção de embriões por diagnóstico pré-implantacional. O projeto conta com pesquisadores e instituições com sólidas trajetórias científicas e assistência a pacientes com DR.

Justificativa:

Embora individualmente a grande maioria das doenças genéticas apresente prevalência baixa, em conjunto, essas doenças raras geram um impacto considerável nos sistemas de saúde. Diretrizes de atenção integral às pessoas com doenças raras no SUS já foram elaboradas pelo Ministério da Saúde (MS) em 2014. Na época, alguns estudos moleculares foram incluídos na investigação diagnóstica, como a pesquisa da síndrome do X-frágil e técnicas direcionadas para a análise de segmentos cromossômicos específicos. Mais recentemente, no final de 2020, uma portaria do MS incluiu o sequenciamento do exoma na investigação de deficiência intelectual de causa indeterminada, reconhecendo a necessidade de análises genômicas mais amplas na elucidação diagnóstica de doenças raras. No entanto, os testes moleculares ainda não estão integrados na rotina da investigação de doenças raras nos serviços de saúde ligados ao SUS.

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) é o maior Centro Terciário de atendimentos médicos da América Latina, com 1,5 milhões atendimentos anuais e contando com diversas especialidades médicas, incluindo a Genética Médica, Endocrinologia e Imunologia, entre outras. Estas especialidades atendem anualmente mais de 18.000 crianças e adolescentes com diversas doenças raras, particularmente aquelas com malformações múltiplas, anomalias craniofaciais, déficit de crescimento, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor/deficiência intelectual, anomalias da imunidade, com grande experiência na área. Além disso, o Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) é o maior centro de atendimento de doenças genéticas desde a década de 60 e já atendeu mais de 100.000 famílias com doenças genéticas raras. Ainda, o CEGH-CEL é um centro de formação de recursos humanos nas áreas de genética/genômica humana e Aconselhamento Genético.

Na atenção global aos indivíduos com doenças raras, o diagnóstico clínico-molecular é uma etapa importante, pois permite definir uma estratégia de seguimento clínico-terapêutico mais adequada e realizar o aconselhamento genético de forma mais precisa, com implicações não apenas para o indivíduo, mas também para sua família. O emprego de técnicas genômicas amplas, como o sequenciamento do exoma, já é considerado por especialistas como uma abordagem inicial de investigação diagnóstica nas doenças mendelianas, embora os resultados obtidos de forma conclusiva estejam abaixo de 50%. Desta forma, outras abordagens de análises genômicas, como as propostas aqui (genoma completo, metiloma, transcriptoma), surgem como estratégias complementares ou mesmo podendo ser empregadas como primeira linha de teste a ser aplicado para este grupo de indivíduos. Outro ponto importante na atenção global dos indivíduos com doenças raras é a prevenção. Este tópico será abordado pela estimativa das doenças recessivas mais prevalentes na população brasileira, a partir da análise de heterozigotos em exames previamente realizados pelos grupos deste estudo, assim como a possibilidade da realização de diagnóstico pré-implantacional em casais selecionados.

Grau de Inovação:

Os três principais objetivos do presente Projeto contêm alto grau de inovação com novas perspectivas científicas e de melhoria da assistência à população, além da formação de recursos humanos na área Genética humana e médica, como se mostrará nos parágrafos seguintes.

Para elevar as percentagens de identificação de defeitos genéticos, optou-se por uma abordagem inovadora através da aplicação de técnicas integradas multiômicas (genoma completo, transcriptoma, metiloma) aos casos clinicamente bem caracterizados, mas sem a elucidação do defeito genético mesmo após sua investigação por técnicas convencionais, incluindo-se aqui o exoma completo e array-CGH (Comparative Genomic Hybridization ? Hibridização Genômica Comparativa) .

A inserção de docentes-pesquisadores do CEGH-CEL e do Instituto da Criança e do Adolescente do HCFMUSP num projeto em elaboração no âmbito da nova Secretaria de Ciência, Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde de São Paulo denominado ?Rede DORA? e que visa à melhoria da assistência a pessoas com DR, poderá estender, de fato, os benefícios desta proposta aos casos de difícil diagnóstico do Estado como um todo. O modelo da ?Rede DORA?, utilizando Telemedicina e se valendo da estabilidade da molécula de DNA para envio

de amostras para laboratórios especializados (o CEGH-CEL será um deles), poderá expandir esses benefícios para outros Estados da nação, contando sempre com a expertise dos especialistas que atuam nas universidades, sobretudo nas públicas, o que poderá trazer maior colaboração entre as mesmas e ganhos significativos tanto de natureza científica como em termos de formação de recursos humanos. Cabe salientar que há muito poucos especialistas na área da Genética Médica em nosso país (pouco mais de 300 clínicos e não mais que uma centena de pesquisadores), sendo ainda mais escassos nas regiões norte e centro-oeste, onde há Estados sem qualquer profissional desta área. Portanto, ter centros de referência como o proposto é altamente relevante.

No segundo objetivo desta Proposta, buscar-se-á definir as doenças recessivas mais prevalentes no nosso país, através da análise de aproximadamente 5.000 genomas já disponíveis, que incluem amostras de indivíduos clinicamente saudáveis (pais de probandos, além de idosos saudáveis cujos genomas já foram seqüenciados) oriundos de todas as regiões do Brasil, cabendo lembrar que o risco de doenças recessivas é ainda maior em populações com maior grau de consanguinidade, como acontece no nordeste brasileiro e certamente também entre as populações indígenas originais e quilombolas. Esta abordagem poderá contribuir para estudos epidemiológicos em doenças recessivas a custo relativamente acessível, uma vez que partirá de dados genômicos já disponíveis. Além da utilidade do conhecimento sobre quais são as doenças recessivas mais frequentes em nosso país para o diagnóstico clínico, a determinação da probabilidade de ocorrência de doenças genéticas recessivas, baseada na frequência de alelos patogênicos na população, permitirá a elaboração de políticas de rastreamento neonatal (já em curso em vários países da comunidade européia) por meio do oferecimento de painéis multigenes construídos com os genes-alvo identificados no Brasil, reduzindo assim o tempo para diagnóstico dos afetados e o estabelecimento de condutas apropriadas. Adicionalmente, permitirá prover aconselhamento genético preciso para casais de risco.

Não restam dúvidas que esse é um objetivo inovador e com grande potencial de trazer benefícios à população, ainda mais se os seus resultados puderem ser cotejados com dados sobre as DR mais frequentemente descritas, como os disponíveis no âmbito da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, e que estão sendo levantados também em outras regiões do Brasil. O objetivo maior das políticas públicas inovadoras que poderão ser desenvolvidas com base nos resultados desses estudos será a prevenção da recorrência de casos, com impactos positivos para as famílias afetadas, para a sociedade e para os serviços de saúde, incluindo aqueles de natureza econômica.

O terceiro objetivo do presente Projeto é o estabelecimento de técnica para diagnóstico genético pré-implantacional para determinar a presença de anormalidades genéticas no DNA de embriões recém fertilizados, a ser realizada em conjunto com técnicas de fertilização in vitro, no âmbito do SUS, em especial nos hospitais universitários, que estarão conectados através da ?Rede DORA?. A análise do embrião antes de sua transferência ao útero, em relação a alterações genéticas pré-definidas, interrompe a corrente de transmissão, evitando o nascimento de um indivíduo com acometimento potencialmente grave.

Risco Tecnológico:

O grande desafio do presente Projeto é a expansão do diagnóstico do defeito genético, que hoje alcança um máximo de 40-50% dos pacientes, mesmo em casuísticas bem exploradas com interação entre clínicos e pesquisadores. Para melhorar esses índices, optamos por aplicar técnicas integradas multiômicas aos casos não elucidados, ou seja, optamos por continuar a investigação através do estudo do genoma completo, do transcriptoma e do metiloma visando a identificar também mecanismos moleculares envolvidos, além do defeito genético. O grande risco tecnológico é, portanto, que, mesmo utilizando esta abordagem inovadora, não se consiga chegar a um diagnóstico! Apesar de termos consciência deste risco, temos também evidências de que estamos trilhando um caminho com boas perspectivas.

Cabe aqui lembrar que o final projeto GENOMA HUMANO foi anunciado em 2013 mesmo se sabendo que ainda havia muitos genes a serem identificados, o que, de fato, vem ocorrendo. Uma evidência disso é que pesquisadores do CEGH-CEL, cujas lideranças estão envolvidas na presente Proposta, identificaram após 2013 inúmeros genes responsáveis por DR. Neste ano a revista Science publicou um novo mapa do genoma humano, que, aliás, foi a capa daquele número e intitulada FILLING THE GAPS (vol 376, issue 6588, 1 April 2022). Apesar dos muitos avanços nesses nove anos, a seqüência de aproximadamente 8% do genoma humano ainda não é conhecida. Assim, as muitas doenças raras ainda não diagnosticadas podem ser resultantes de mutações nas regiões não codificadoras, de inversões, de alterações epigenéticas e de outras condições, que poderão vir a ser desvendadas neste Projeto, que tem como um dos pontos fortes a associação de clínicos experientes na seleção e descrição dos casos com pesquisadores reconhecidos internacionalmente por seu trabalho inovador.

Outros riscos que se apresentam são representados por:

1) Limitação de se conseguirem amostras de boa qualidade do paciente e em especial de seus pais (trio), risco esse que será minimizado por cuidados técnicos já no âmbito do laboratório do hospital e pela disponibilidade de se abordar a mãe, que permanece ao lado da criança internada e a quem se procura oferecer atenção e acolhimento, assim como aos demais familiares;

Relevância e abrangência da Inovação para atingimento do obj. da Seleção pública e Linha Temática:

Esta proposta resulta do estabelecimento de uma rede de colaboradores de cinco áreas de atuação da USP - Pediatria, Endocrinologia, Genética/Genômica e Ginecologia/Reprodução Humana, de forma a estabelecer um grupo de pesquisadores com experiência em áreas complementares que propiciarão desenvolver um projeto integrado desde o desenvolvimento de novas ferramentas para análise genômica, melhor diagnóstico, desenvolvimento de ferramentas em epidemiologia genômica e aconselhamento genético para doenças genéticas pediátricas.

A nossa proposta está relacionada a Linha temática 1 ? Rastreamento, diagnóstico e marcadores prognósticos de Doença Rara (DR) com foco nos seguintes subtemas:

- a) Aprimoramento de análises genômicas em larga escala e análises integradas de bioinformática para melhorar o diagnóstico de DR;
- b) Novos métodos para rastreamento neonatal e diagnóstico de DR para atualização das tecnologias implementadas no SUS.

Metodologia:

A casuística será composta de indivíduos com doenças raras de provável etiologia genética já em seguimento em ambulatórios especializados no HC-FMUSP e CEGH-CEL, com estudos genéticos prévios negativos para a hipótese clínica ou novos casos atendidos nestes Centros.

Os estudos moleculares serão realizados no CEGH-CEL, sob supervisão da Prof. Dra. Maria Rita Passos-Bueno.

Para o estudo do sequenciamento do exoma/genoma/transcriptoma/metiloma:

DNA/RNA será extraído dos leucócitos do sangue periférico, quantificados e observada a sua integridade. O sequenciamento de exoma/RNAseq será realizado utilizando-se a plataforma NovaSeq (Illumina, San Diego, Califórnia, EUA) na central de multiusuários do CEGH- Análise das variantes:

A análise de variantes identificadas seguirá protocolos bem estabelecidos que visam a buscar variantes raras (MAF = 1%), com potencial efeito deletério para a expressão, processamento de splicing ou para a proteína, utilizando-se diversas ferramentas in silico disponíveis. As variantes encontradas serão classificadas de acordo com critérios propostos pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica¹.

Para o sequenciamento do genoma, será objetivada uma cobertura média de no mínimo 30X. A biblioteca é preparada com o kit illumina DNA PCR-free Prep.

Para o transcriptoma, as amostras serão processadas para a captura dos RNAs mensageiros, os quais serão convertidos em DNA complementar (cDNA). Na preparação da biblioteca será utilizado o Zymo-SeqRiboFree Total RNA Library Kit? Zymo Research, o qual permite a obtenção de bibliotecas indexadas livres de RNAs ribossômicos (rRNA). Como o objetivo será identificar casos de splicing anormais causados por variantes não identificadas no sequenciamento do exoma, os dados brutos serão submetidos a teste de qualidade; em seguida alinhados e mapeados utilizando a ferramenta STAR e finalmente submetidos para a checagem de eventos de splicing anormal com a ferramenta FRASER.

Para a análise de CNVs no sequenciamento do exoma serão utilizadas as seguintes ferramentas de bioinformática: XHMM, panelcn.mops e cnvkit, em uso no CEGH-CEL. Para a análise de alterações estruturais no sequenciamento do genoma, serão utilizadas as ferramentas de bioinformática Parliament e CNVKit.

Para análise do Metiloma, amostras de DNA extraídas de sangue periférico serão submetidas a conversão de bissulfito. Em seguida, serão analisadas com "arrays" Illumina EPIC bead chip arrays, os quais serão realizados na Central de Serviços de Citogenômica, FMUSP. Estes arrays incluem a análise de 860.000 sítios de metilação CpG, incluindo 99% de genes RefSeq e 96% de ilhas. Os protocolos de análise serão de acordo com Bend et al. 2019 e Aref-Eshghiet al 2020.

Frequência de heterozigotos em estudos genômicos (sequenciamento do exoma/genoma) já realizados:

Os dados brutos de indivíduos que realizaram os exames como controles (indivíduos não afetados), como parte de pesquisas não associadas a doenças de manifestação da infância ou indivíduos com doenças com um padrão de herança dominante, já estão disponíveis em banco de dados de 3 grupos participantes deste projeto, com um número total próximo de 8.000 indivíduos. Esta amostragem permitiria, com poder estatístico de 90%, identificar conjuntos de variantes em um determinado gene causador de doença recessiva com frequência alélica na população de 0,04%, o que corresponde a um risco de homozigotos na população até 1 para 10 milhões. Os arquivos com as listagens das variantes (VCFs) serão coletados, um de cada família analisada, e anonimizados para as análises subsequentes, apenas mantendo informação do sexo e procedência geográfica. Em amostras com alto grau de correlação genética (> 25%), apenas uma delas será mantida. Serão analisadas variantes em heterozigose em genes definidos pelos pesquisadores levando em conta genes com fenótipo estabelecido no OMIM ou no ClinGen; com herança autossômica recessiva ou ligada ao X, os quais preencham os seguintes critérios: passem pelo filtro de qualidade e em região com cobertura mínima de 20x; sejam variantes do tipo perda de função e/ou variantes já reportadas como patogênicas ou possivelmente patogênicas no ClinVar com 1 a 3 estrelas e sem conflito de interpretação entre as submissões. A ancestralidade de cada amostra será avaliada e o resultado será correlacionado com a presença de variantes alélicas de risco para as doenças recessivas que apresentarem maior risco de ocorrência espontânea na nossa população.

Diagnóstico pré-implantacional

O PGT-M permite a seleção de embriões não afetados para uma variante familiar em questão e pode ser usado para prevenção de distúrbios de gene único.

O tratamento inicia-se pela estimulação da ovulação com gonadotrofinas, aspiração dos folículos ovarianos, para captura dos óvulos, fertilização dos mesmos com espermatozoides do conjuge, cultivo embrionário até o estágio de blastocisto, performando-se então a biopsia do trofoectoderma do embrião. A seguir, o embrião é congelado e a amostra enviada para análise. Após essa etapa, o material é submetido a reação de amplificação direcionada via PCR multiplex seguida por análises específicas por método de PCR ou NGS.

Referências:

1. Richards S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405-24.
2. Aref-Eshghi, E. et al. Evaluation of DNA methylation epigenotypes for diagnosis and phenotype correlations in 42 Mendelian neurodevelopmental disorders. Am J Hum Genet. 2020 Mar 5;106(3):356-370.
3. Bend, E. G. et al. Gene domain-specific DNA methylation epigenotypes highlight distinct molecular entities of ADNP syndrome. Clin Epigenetics 2019 Apr 27;11(1):64.
4. De Rycke M, Berckmoes V. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders. Genes (Basel). 2020 Jul 31;11(8):871.

Palavras-chave:

DOENÇAS RARAS GENÉTICAS
SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA
TRANSCRIPTOMA (análise de RNA mensageiro)
METILOMA (análise de metilação global)
DOENÇAS RECESSIVAS RARAS NA POPULAÇÃO BRASILEIRAS
FREQUÊNCIA ALÉLICA DE HETEROZIGOTOS

Resultados esperados:

Identificação e caracterização de novas síndromes genéticas raras
Estabelecer a metodologia de análise de metiloma global para auxílio no diagnóstico de doenças raras
Aplicação do sequenciamento completo do genoma e transcriptoma para esclarecimento diagnóstico e identificação de novos mecanismos genéticos para doenças raras
Aplicar o diagnóstico pré-implantacional em casos de doenças genéticas raras como prova de conceito do potencial da técnica como ferramenta preventiva para doenças genéticas raras
Desenvolvimento de banco de dados de variantes genéticas associadas a doenças raras na população Brasileira, permitindo estabelecer estratégias de rastreamento populacional
Formação de recursos humanos nas técnicas empregadas no projeto e no cuidado de pacientes com doenças raras
Produção de material para divulgação e esclarecimento de médicos e para a população geral dos métodos diagnósticos de doenças raras
Gerar informações que auxiliarão políticas públicas para identificação de doenças raras e uso racional das metodologias para seu diagnóstico.
Identificação etiológica de doenças genéticas raras, permitindo a realização do aconselhamento genético, incluindo diagnóstico pré-implantacional para casais selecionados
Estimativa da prevalência de doenças genéticas recessivas na população brasileira a partir da frequência alélica de portadores.

PLANO DE TRABALHO		Área: AIN3
Edital Doenças Raras		Depto: DSAQ
FFM - FFM - 803340	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340

B.1. CRONOGRAMA FÍSICO

META FÍSICA: 1 - Etapa de sequenciamento genético e análises (metiloma/transcriptoma)

ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
1 - Avaliação de elegibilidade de pacientes para estudo	Análise de pelo menos 150 pacientes para seleção dos 50 mais adequados para próximas etapas	1	6
2 - Seleção final dos pacientes	50 casos que preenchem os critérios de inclusão e exclusão com caracterização fenotípica	5	7
3 - Coleta de DNA	Obtenção de amostras dos 50 pacientes selecionados e seus familiares	5	8
4 - Sequenciamento completo do genoma	sequenciamento completo do genoma nas amostras selecionadas (n=150, pacientes e seus familiares)	7	17
5 - Seleção de casos para sequenciamento do RNA	Seleção de 20 casos e do racional para o estudo do RNA	7	19
6 - Obtenção de material biológico para sequenciamento do RNA	Obtenção de sangue periférico ou fibroblastos dos 20 casos para análise por sequenciamento de RNA	7	19
7 - Realização do sequenciamento do RNA	Realização do sequenciamento do RNA de 20 amostras	10	20
8 - Análise dos resultados e estudos confirmatórios	Término da análise dos 20 casos selecionados	12	26
9 - Seleção de casos para metiloma	Seleção de 20 pacientes, 20 controles positivos e 20 controles negativos	12	14
10 - Obtenção de material biológico para metiloma	60 amostras coletadas	14	16
11 - Realização do metiloma e análise	Realizar a caracterização do perfil de metilação nos 20 pacientes em comparação com os 40 controles	16	28

META FÍSICA: 2 - Estudo em fertilização in vitro

ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
1 - Seleção de 5 casais para Diagnóstico pré-implantacional	Avaliação de 15 casais para seleção de 5	1	12

PLANO DE TRABALHO		Área: AIN3
Editais Doenças Raras		Depto: DSAQ
FFM - FFM - 803340	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340

B.1. CRONOGRAMA FÍSICO

META FÍSICA: 2 - Estudo em fertilização in vitro

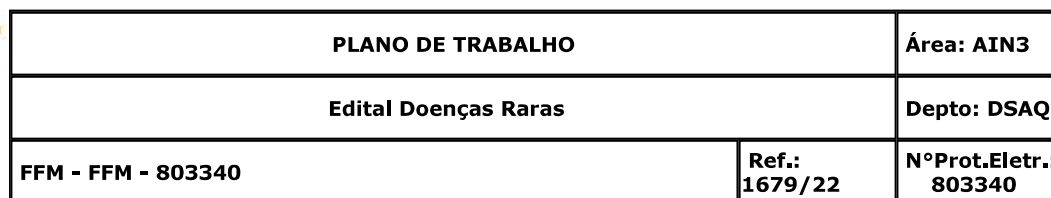
ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
2 - Procedimentos para fertilização in vitro e seleção de embriões	Todos os procedimentos propostos e obtenção da gravidez de 5 casos	6	24
3 - Acompanhamento da gravidez e avaliação dos recém-nascidos	relatório sobre acompanhamento da gravidez 5 casos	10	34

META FÍSICA: 3 - Tratamento final dos dados

ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
1 - Seleção e envio dos arquivos BAM ou FASTq	Obtenção em um banco de dados central os arquivos brutos de 5.000 sequenciamentos completo do exoma e genoma	1	10
2 - Alinhamento de todos os dados pelo GRCh38	Obter arquivos BAM das 5.000 amostras homogeneamente alinhados para GRCh38	10	14
3 - Chamada das variantes	Gerar os arquivos com a listagem das variantes e genótipo de 5.000 amostras	14	20
4 - Seleção de variantes deletérias raras em genes de herança recessiva	Gerar um arquivo com as variantes de interesse	20	26
5 - Criação do banco de dados público	Apresentação de banco de dados público	27	32

META FÍSICA: 4 - Divulgação científica dos resultados

ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
1 - Divulgação científica dos resultados	Submissão de 6 manuscritos em revistas de alto impacto, divulgação em congressos	20	36



B.3.1 PLANO DE APLICAÇÃO

(Valores em R\$)

[illegible]

PLANO DE TRABALHO		Área: AIN3
Edital Doenças Raras		Depto: DSAQ
FFM - FFM - 803340	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340

B.3.3. ORÇAMENTO

B.3.3. CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO / FNDCT

(Valores em R\$)

METAS FINANCEIRAS		PARCELAS (MÊS)			TOTAL
Código	Grupos/Elementos de Despesas	1ª (1)	2ª (13)	3ª (25)	
3. DESPESAS CORRENTES		830.925,16	646.000,00	516.503,05	1.993.428,21
31.00.00	Pessoal e Encargos Sociais	0,00	0,00	0,00	0,00
31.00.11/12	Vencimentos e Vantagens Fixas (Pessoal Civil/Militar)	0,00	0,00	0,00	0,00
31.00.13	Obrigações Patronais	0,00	0,00	0,00	0,00
31.00.14	Pagamento de Pessoal	0,00	0,00	0,00	0,00
33.00.00	Outras Despesas Correntes	830.925,16	646.000,00	516.503,05	1.993.428,21
33.00.14/15	Diárias (Pessoal Civil/Militar)	0,00	0,00	0,00	0,00
33.00.30	Material de Consumo	15.500,00	0,00	135.500,00	151.000,00
33.00.33	Passagens e Despesas com Locomoção	0,00	0,00	0,00	0,00
33.00.36	Outros serviços de Terceiros / Pessoa Física	0,00	0,00	0,00	0,00
33.00.39	Outros serviços de Terceiros / Pessoa Jurídica	589.925,16	400.000,00	135.003,05	1.124.928,21
33.90.18	Serviços de Terceiros - Bolsas	225.500,00	246.000,00	246.000,00	717.500,00
33.90.20	Auxílio Financeiro a Pesquisadores	0,00	0,00	0,00	0,00
4. DESPESAS DE CAPITAL		0,00	0,00	0,00	0,00
44.00.00	Investimentos	0,00	0,00	0,00	0,00
44.00.51	Obras e Instalações	0,00	0,00	0,00	0,00
44.00.52	Equipamentos e Material Permanente	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL GERAL		830.925,16	646.000,00	516.503,05	1.993.428,21

Edital Doenças Raras	Área: AIN3	Depto.: DSAQ
FFM - FFM - 803340	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340

B.3.3. ORÇAMENTO

B.3.3. CONTRAPARTIDA

(Valores em R\$)

Instituição: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO [Executor]

METAS FINANCEIRAS		CONTRAPARTIDA FINANCEIRA		CONTRAPARTIDA NÃO FINANCEIRA
		PARCELAS (MÊS)	TOTAL	
Código	Grupos/Elementos de Despesas	1ª ()		
3. DESPESAS CORRENTES		0,00	0,00	0,00
31.00.00	Pessoal e Encargos Sociais	0,00	0,00	0,00
31.00.11/12	Vencimentos e Vantagens Fixas (Pessoal Civil/Militar)	0,00	0,00	0,00
31.00.13	Obrigações Patronais	0,00	0,00	0,00
31.00.14	Pagamento de Pessoal	0,00	0,00	0,00
33.00.00	Outras Despesas Correntes	0,00	0,00	0,00
33.00.14/15	Diárias (Pessoal Civil/Militar)	0,00	0,00	0,00
33.00.30	Material de Consumo	0,00	0,00	0,00
33.00.33	Passagens e Despesas com Locomoção	0,00	0,00	0,00
33.00.36	Outros serviços de Terceiros / Pessoa Física	0,00	0,00	0,00
33.00.39	Outros serviços de Terceiros / Pessoa Jurídica	0,00	0,00	0,00
33.90.18	Serviços de Terceiros - Bolsas	0,00	0,00	0,00
33.90.20	Auxílio Financeiro a Pesquisadores	0,00	0,00	0,00
4. DESPESAS DE CAPITAL		0,00	0,00	0,00
44.00.00	Investimentos	0,00	0,00	0,00
44.00.51	Obras e Instalações	0,00	0,00	0,00
44.00.52	Equipamentos e Material Permanente	0,00	0,00	0,00
TOTAL GERAL		0,00	0,00	0,00

Edital Doenças Raras	Área: AIN3	Depto.: DSAQ
FFM - FFM - 803340	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340

B.3.3. ORÇAMENTO

B.3.3. CONTRAPARTIDA

(Valores em R\$)

Instituição: FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA [Proponente]

METAS FINANCEIRAS		CONTRAPARTIDA FINANCEIRA		CONTRAPARTIDA NÃO FINANCEIRA
		PARCELAS (MÊS)	TOTAL	
Código	Grupos/Elementos de Despesas	1ª ()		
3. DESPESAS CORRENTES		0,00	0,00	0,00
31.00.00	Pessoal e Encargos Sociais	0,00	0,00	0,00
31.00.11/12	Vencimentos e Vantagens Fixas (Pessoal Civil/Militar)	0,00	0,00	0,00
31.00.13	Obrigações Patronais	0,00	0,00	0,00
31.00.14	Pagamento de Pessoal	0,00	0,00	0,00
33.00.00	Outras Despesas Correntes	0,00	0,00	0,00
33.00.14/15	Diárias (Pessoal Civil/Militar)	0,00	0,00	0,00
33.00.30	Material de Consumo	0,00	0,00	0,00
33.00.33	Passagens e Despesas com Locomoção	0,00	0,00	0,00
33.00.36	Outros serviços de Terceiros / Pessoa Física	0,00	0,00	0,00
33.00.39	Outros serviços de Terceiros / Pessoa Jurídica	0,00	0,00	0,00
33.90.18	Serviços de Terceiros - Bolsas	0,00	0,00	0,00
33.90.20	Auxílio Financeiro a Pesquisadores	0,00	0,00	0,00
4. DESPESAS DE CAPITAL		0,00	0,00	0,00
44.00.00	Investimentos	0,00	0,00	0,00
44.00.51	Obras e Instalações	0,00	0,00	0,00
44.00.52	Equipamentos e Material Permanente	0,00	0,00	0,00
TOTAL GERAL		0,00	0,00	0,00

RELAÇÃO DE ITENS ORIGINAL**Editais Doenças Raras****FFM - FFM - 803340****Nº Protocolo:
803340****B.3. ORÇAMENTO****B.3.4 RELAÇÃO DOS ITENS SOLICITADOS/FNDCT1****33.00.30: Material de Consumo Nacional**

HCFMUSP					
Descrição	Finalidade	Destinação	Qtd.	Valor Unitário(R\$)	Total (R\$)
Insumos FIV/ICSI - Gineco	estimulação da ovulação, captação de óvulos, fertilização in vitro, seleção de embriões não afetados para transferência para o útero materno e acompanhamento pós-implantacional, gestação e parto	FFM	1	14.000,00	14.000,00
Medicamentos indução ovulação FIV/ICSI Gineco	estimulação da ovulação para a fertilização em vitro	FFM	1	17.000,00	17.000,00
Reagentes para a realização de Técnicas de genética-molecular tradicional	orçamento inclui técnicas complementares como sequenciamento tipo Sanger, real-time PCR, análise de cromossomos por array, sequenciamento completo do exoma (WES), MLPA, MS-MLPA, entre outros	FFM	1	120.000,00	120.000,00

VALOR TOTAL DO ELEMENTO DE DESPESA:**151.000,00**

B.3. ORÇAMENTO

B.3.4 RELAÇÃO DOS ITENS SOLICITADOS/FNDCT1

33.00.39: Outras Despesas com Serviços de Terceiros/Pessoa Jurídica

HCFMUSP							
Descrição	Finalidade	Destinação	Qtd.	Periodo	Encargos(R\$)	Valor Unitário(R\$)	Total (R\$)
Sequenciamento completo Genoma CEGH	Etapas essenciais para buscar a elucidação da etiologia genética de casos já amplamente investigados e sem solução. A metodologia está no centro do objetivo do projeto	FFM	150	10	0	400,00	600.000,00
Procedimentos de metiloma global ? reagentes	Técnica que será usada de forma complementar ao sequenciamento completo do genoma; esta estratégia poderá dar suporte e melhor caracterização de novos mecanismos de doença ou novas síndromes genéticas	FFM	60	14	0	142,86	120.002,40
Procedimentos de transcriptoma (RNAseq)	Abordagem que será usada de forma integrada ao sequenciamento completo do genoma e pode dar suporte e melhor caracterização de novos mecanismos de doença ou novas síndromes genéticas	FFM	20	12	0	166,67	40.000,80
Diagnóstico Genético Pré-Implantacional	pretendido realizar a seleção de 5 casais sob risco de terem filhos com doenças genéticas raras com base molecular já caracterizada para receberem suporte para fertilização in vitro com diagnóstico	FFM	5	12	0	2.000,00	120.000,00

B.3. ORÇAMENTO

B.3.4 RELAÇÃO DOS ITENS SOLICITADOS/FNDCT1

33.90.18: Serviços de Terceiros - Bolsas

HCFMUSP							
Justificativa	Nome Bolsista	Destinação	Tipo de Bolsa	Nº Meses	Hora/Mes	Valor Hora	Total (R\$)
Ficará responsável pela organização das amostras de DNA e RNA coletadas pelos pesquisadores da FMUSP. Participará da análise genômica	A contratar 1	FFM		35	125	32,80	143.500,00
Ficará responsável pela organização das amostras de DNA e RNA coletadas no CEGH-CEL para análises ômicas.	A contratar 2	FFM		35	125	32,80	143.500,00
Ficará responsável pela análise de exomas e genomas realizadas no projeto. Trabalhará de forma integrada com os outros bolsistas da área da saúde	A contratar 3	FFM		35	125	32,80	143.500,00
Ficará responsável pela análise de transcriptoma e metiloma realizadas no projeto.	A contratar 4	FFM		35	125	32,80	143.500,00
Ficará resp. da seleção dos casais para realização de fertilização in vitro, com diagnóstico embrionário pre-implantacional	A contratar 5	FFM		35	125	32,80	143.500,00

VALOR TOTAL DO ELEMENTO DE DESPESA:

717.500,00

EDITAL DOENÇAS RARAS		
DORA - BR	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340
ABORDAGEM INTEGRADA NO DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS GENÉTICAS RARAS: DAS MULTIÔMICAS A PREVENÇÃO		Contrato/Convênio Finep:

METAS FÍSICAS

Etapa de sequenciamento genético e análises (metiloma/transcriptoma)

- Avaliação de elegibilidade de pacientes para estudo Período: 1 a 6
- Seleção final dos pacientes Período: 5 a 7
- Coleta de DNA Período: 5 a 8
- Sequenciamento completo do genoma Período: 7 a 17
- Seleção de casos para sequenciamento do RNA Período: 7 a 19
- Obtenção de material biológico para sequenciamento do RNA Período: 7 a 19
- Realização do sequenciamento do RNA Período: 10 a 20
- Análise dos resultados e estudos confirmatórios Período: 12 a 26
- Seleção de casos para metiloma Período: 12 a 14
- Obtenção de material biológico para metiloma Período: 14 a 16
- Realização do metiloma e análise Período: 16 a 28

Estudo em fertilização in vitro

- Seleção de 5 casais para Diagnóstico pré-implantacional Período: 1 a 12
- Procedimentos para fertilização in vitro e seleção de embriões Período: 6 a 24
- Acompanhamento da gravidez e avaliação dos recém-nascidos Período: 10 a 34

Tratamento final dos dados

- Seleção e envio dos arquivos BAM ou FASTq Período: 1 a 10
- Alinhamento de todos os dados pelo GRCh38 Período: 10 a 14
- Chamada das variantes Período: 14 a 20
- Seleção de variantes deletérias raras em genes de herança recessiva Período: 20 a 26
- Criação do banco de dados publico Período: 27 a 32

Divulgação científica dos resultados

- Divulgação científica dos resultados Período: 20 a 36

EDITAL DOENÇAS RARAS		
DORA - BR	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340
ABORDAGEM INTEGRADA NO DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS GENÉTICAS RARAS: DAS MULTIÔMICAS A PREVENÇÃO		Contrato/Convênio Finep:

METAS FÍSICAS COM EQUIPE

Divulgação científica dos resultados

- Divulgação científica dos resultados Período: 20 a 36
A contratar 4

Etapa de sequenciamento genético e análises (metiloma/transcriptoma)

- Avaliação de elegibilidade de pacientes para estudo Período: 1 a 6
Magda Maria Sales Caneiro Sampaio

Divulgação científica dos resultados

- Divulgação científica dos resultados Período: 20 a 36
A contratar 2
A contratar 1
Chong Ae Kim
Andreia Cristiane Rangel-Santos
Fernanda Bernardi Bertonha
Renata da Cunha Scalco
Mariz Vainzof
Mayana Zatz
Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Magda Maria Sales Caneiro Sampaio

Tratamento final dos dados

- Criação do banco de dados publico Período: 27 a 32
- Seleção de variantes deletérias raras em genes de herança recessiva Período: 20 a 26
- Chamada das variantes Período: 14 a 20
- Alinhamento de todos os dados pelo GRCh38 Período: 10 a 14
- Seleção e envio dos arquivos BAM ou FASTq Período: 1 a 10
Chong Ae Kim
Andreia Cristiane Rangel-Santos
Mariz Vainzof
Mayana Zatz
Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Magda Maria Sales Caneiro Sampaio

Estudo em fertilização in vitro

- Acompanhamento da gravidez e avaliação dos recém-nascidos Período: 10 a 34
- Procedimentos para fertilização in vitro e seleção de embriões Período: 6 a 24
- Seleção de 5 casais para Diagnóstico pré-implantacional Período: 1 a 12
Chong Ae Kim
Fernando Kok
Renata da Cunha Scalco

Werther Brunow de Carvalho
Mayana Zatz
Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Débora Romeo Bertola
Ana Claudia Latrônico Xavier
Berenice Bilharino de Mendonça
Alexander Augusto de Lima Jorge
Magda Maria Sales Caneiro Sampaio

Etapas de sequenciamento genético e análises (metiloma/transcriptoma)

- Realização do metiloma e análise Período: 16 a 28
- Obtenção de material biológico para metiloma Período: 14 a 16
- Seleção de casos para metiloma Período: 12 a 14
- Análise dos resultados e estudos confirmatórios Período: 12 a 26
- Realização do sequenciamento do RNA Período: 10 a 20
- Obtenção de material biológico para sequenciamento do RNA Período: 7 a 19
- Seleção de casos para sequenciamento do RNA Período: 7 a 19
- Sequenciamento completo do genoma Período: 7 a 17
- Coleta de DNA Período: 5 a 8
- Seleção final dos pacientes Período: 5 a 7
- Avaliação de elegibilidade de pacientes para estudo Período: 1 a 6

Chong Ae Kim
Fernando Kok
Renata da Cunha Scalco
Werther Brunow de Carvalho
Mayana Zatz
Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Débora Romeo Bertola
Ana Claudia Latrônico Xavier
Berenice Bilharino de Mendonça
Alexander Augusto de Lima Jorge

Divulgação científica dos resultados

- Divulgação científica dos resultados Período: 20 a 36
- A contratar 3

EDITAL DOENÇAS RARAS		
DORA - BR	Ref.: 1679/22	NºProt.Eletr.: 803340
ABORDAGEM INTEGRADA NO DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS GENÉTICAS RARAS: DAS MULTIÔMICAS A PREVENÇÃO		Contrato/Convênio Finep:

EQUIPE EXECUTORA

CPF	Nome	Função	Titulação	Tipo Equipe	Nº de Meses	Hrs/Semana	Hrs/Mês	Rec. Adic.
000.000.000-00	A contratar 1	BOLSISTA	Doutor	NULO	35	32		N
000.000.000-00	A contratar 2	BOLSISTA	Doutor	NULO	35	32		N
000.000.000-00	A contratar 3	BOLSISTA	Doutor	NULO	35	31		N
000.000.000-00	A contratar 4	BOLSISTA	Doutor	NULO	35	31		N
000.000.000-00	A contratar 5	BOLSISTA	Doutor	NULO	35	31		N
247.870.098-00	Alexander Augusto de Lima Jorge	COORDENADOR GERAL	Doutor	NULO	36	8		N
118.121.718-03	Ana Claudia Latrônico Xavier	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
123.725.628-35	Ana Cristina Krepischi	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
098.563.898-28	Andreia Cristiane Rangel-Santos	APOIO TÉCNICO	Doutor	NULO	36	8		N
686.190.498-87	Berenice Bilharino de Mendonça	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
995.469.908-25	Chong Ae Kim	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
129.353.458-78	Débora Romeo Bertola	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
826.230.828-04	Edmund Chada Baracat	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
284.885.318-26	Fernanda Bernardi Bertonha	APOIO TÉCNICO	Doutor	NULO	36	8		N
007.045.428-03	Fernando Kok	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
009.053.224-44	Guilherme Lopes Yamamoto	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	10		N
618.499.288-00	João Bosco de Oliveira Filho	PESQUISADOR VISITANTE	Doutor	NULO	36	8		N
807.759.858-72	Magda Maria Sales Caneiro Sampaio	COORDENADOR GERAL	Doutor	NULO	36	10		N
119.139.968-08	Marcus Welby Pacheco Lima	APOIO ADMINISTRATIVO	Especialista	NULO	36	4		N
364.847.845-15	Maria Rita dos Santos e Passos Bueno	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
307.856.238-76	Marilia Moreira Montenegro	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
023.228.478-44	MARINA PIRES RIO CALDEIRA	APOIO ADMINISTRATIVO	Mestre	NULO	36	4		N
225.798.518-44	Mariz Vainzof	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
668.876.588-87	Mayana Zatz	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
009.053.224-44	Michel Satya Naslavsky	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
129.036.588-11	Pedro Augusto Araujo Monteleone	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
106.751.288-89	Regina Célia Mingroni Netto	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
223.905.648-79	Renata da Cunha Scalco	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
171.239.878-45	Silvia Yumi Bando Takahara	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N
281.564.049-04	Werther Brunow de Carvalho	PESQUISADOR	Doutor	NULO	36	8		N

EQUIPE CIENTÍFICA

Projeto não possui equipe científica.

BOLSISTAS

Projeto não possui bolsas.