



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

CARLOS ANTÔNIO DE ARROXELAS SILVA

**APLICAÇÕES CLÍNICAS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO: DA
GENÔMICA EM NEUROPSIQUIATRIA AO DESENVOLVIMENTO DE UM
PROTOCOLO DE METAGENÔMICA CLÍNICA NO CEARÁ**

FORTALEZA

2025

CARLOS ANTÔNIO DE ARROXELAS SILVA

APLICAÇÕES CLÍNICAS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO: DA
GENÔMICA EM NEUROPSIQUIATRIA AO DESENVOLVIMENTO DE UM
PROTOCOLO DE METAGENÔMICA CLÍNICA NO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina I.

Orientador: Dr. Fábio Miyajima.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S579a Silva, Carlos Antônio de Arroxelas.

Aplicações clínicas de sequenciamento de nova geração : da genômica em neuropsiquiatria ao desenvolvimento de um protocolo de metagenômica clínica no Ceará / Carlos Antônio de Arroxelas Silva. – 2025.

94 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Fabio Miyajima.

1. Sequenciamento de Nova Geração. 2. Genômica Clínica. 3. Genômica Clínica. 4. Medicina de Precisão. I. Título.

CDD 615.1

CARLOS ANTÔNIO DE ARROXELAS SILVA

APLICAÇÕES CLÍNICAS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO: DA
GENÔMICA EM NEUROPSIQUIATRIA AO DESENVOLVIMENTO DE UM
PROTOCOLO DE METAGENÔMICA CLÍNICA NO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina I.

Aprovado em: 30/09/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Miyajima

Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Paulo Ribeiro Nóbrega

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca

Universidade Federal do Ceará

Dedico este trabalho a todos que, de alguma forma, caminharam comigo nesta jornada – com palavras, gestos, apoio ou inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à sua amada Mãe, a Virgem Maria, por, na obscuridade de meus receios, terem me inspirado sabedoria, inteligência, ciência e fortaleza, sendo a luz da esperança que tornou o impossível em realidade.

À Universidade Federal do Ceará, em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz Ceará, pela oportunidade ímpar de cursar o mestrado em Ciências Médicas e por proporcionar um ambiente fértil para o desenvolvimento da pesquisa científica. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, pois fui bolsista e recebi seu apoio – Código de Financiamento 001.

Ao Prof. Dr. Fábio Miyajima, pelos anos de convivência e orientação, nos quais não apenas compartilhou conhecimento, mas também me inspirou profundamente. Sua dedicação foi essencial ao meu amadurecimento científico, profissional e humano.

À equipe laboratorial e de bioinformática da Fundação Oswaldo Cruz Ceará, em especial à Msc. Alice Paula Di Sabatino Guimarães e ao Dr. Allysson Allan de Farias. Agradeço pela contribuição técnica, que foi crucial para o desenvolvimento deste estudo, e, de igual modo, pelo inestimável apoio e suporte emocional ao longo da jornada.

Ao corpo clínico e às equipes assistenciais da rede hospitalar participante, em especial ao Dr. Paulo Ribeiro Nóbrega, pelo valioso apoio técnico-científico e pela parceria na condução do estudo.

A todos os professores que perpassaram minha trajetória, cujos ensinamentos e exemplos foram fundamentais para que eu chegassem até aqui. Minha gratidão é imensa.

Aos meus pais, José Severino da Silva e Maria da Glória de Arroxelas Silva, expresso minha mais profunda gratidão. Foram os senhores que me forneceram a base educacional e os valores e princípios que norteiam minha vida.

À minha esposa, Clelinda Costa da Silva, companheira indispensável. Pela paciência, compreensão e apoio irrestrito nos momentos de maior dificuldade desta jornada, e por compartilhar a alegria de cada vitória. Esta dissertação não seria realidade sem a sua força ao meu lado.

À minha irmã, Carmem Lúcia de Arroxelas Silva, meu reconhecimento pelo duplo amparo: o suporte emocional que me deu tranquilidade e o apoio científico que me impulsionou. Sua presença foi fundamental em todas as etapas.

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível." (São Francisco de Assis).

RESUMO

A elucidação etiológica de afecções neuropsiquiátricas e infecciosas complexas representa um desafio crítico no Sistema Único de Saúde, frequentemente resultando em longas jornadas diagnósticas. Este estudo objetivou avaliar as aplicações clínicas do sequenciamento de nova geração em abordagens genômicas e metagenômicas realizadas na Fiocruz Ceará em casos clínicos complexos oriundos da Atenção Terciária de Fortaleza. A abordagem genômica (sequenciamento de exoma) foi aplicada a uma coorte de 17 casos clínicos, a qual foi subdividida em coorte psiquiátrica (n=9) e coorte neurológica (n=8), enquanto a metagenômica foi utilizada para investigar um caso de neuroinfecção sem diagnóstico confirmatório por métodos convencionais. Concomitantemente, uma pesquisa operacional, incluindo uma estimativa participativa com a equipe técnica, mapeou as barreiras sistêmicas do fluxo diagnóstico. A investigação genômica revelou achados clinicamente relevantes na coorte e permitiu o estabelecimento de um diagnóstico molecular de alta probabilidade em 37,5% da subcoorte neurológica com curadoria clínica especializada, tendo como ênfase a identificação de rara variante em gene NIT1 em paciente de 50 anos com histórico de Leucodistrofia. A análise metagenômica foi decisiva para o diagnóstico confirmatório de Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva por vírus John Cunningham em um paciente com HIV. A pesquisa operacional quantificou os obstáculos, identificando a lacuna de informações clínicas como a principal barreira de comunicação (apontada por 100% da equipe). Esses resultados, que unem a evidência clínica à operacional, fundamentaram a elaboração das bases de um protocolo técnico-operacional colaborativo, estruturado no modelo Assistência Clínica-Laboratório-Bioinformática (*Clinical-Wet-Dry*), para a integração do sequenciamento de nova geração na rede de saúde do Ceará articulada pela Fiocruz Ceará. Conclui-se que a aplicação do sequenciamento de nova geração, quando guiada por uma abordagem translacional, não apenas amplia substancialmente a resolutividade diagnóstica, mas também gera um modelo de implementação viável e baseado em evidências para a incorporação de tecnologias de precisão no sistema de saúde, com potencial para otimizar condutas clínicas e fortalecer a vigilância em saúde.

Palavras-chave: Sequenciamento de Nova Geração; Genômica Clínica; Metagenômica Clínica; Medicina de Precisão.

ABSTRACT

The etiological elucidation of complex neuropsychiatric and infectious disorders represents a critical challenge within Brazil's Unified Health System, often resulting in prolonged diagnostic journeys. This study aimed to evaluate the clinical applications of next-generation sequencing through genomic and metagenomic approaches conducted at Fiocruz Ceará in complex clinical cases referred from tertiary care in Fortaleza. The genomic approach (whole-exome sequencing) was applied to a cohort of 17 patients, subdivided into a psychiatric cohort ($n=9$) and a neurological cohort ($n=8$), while metagenomics was employed to investigate a case of neuroinfection without confirmatory diagnosis using conventional methods. Concurrently, an operational research component, including a participatory assessment with the technical team, mapped systemic barriers in the diagnostic pathway. Genomic investigation revealed clinically relevant findings across the cohort and enabled the establishment of a highly probable molecular diagnosis in 37,5% of the neurological subcohort with specialized clinical curation, notably highlighting the identification of a rare NIT1 variant in a 50-year-old patient with a history of leukodystrophy. Metagenomic analysis was decisive for the confirmatory diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy caused by John Cunningham virus in an HIV-positive patient. Operational research quantified barriers, identifying the lack of clinical information as the main communication gap (reported by 100% of the team). These results, integrating clinical and operational evidence, supported the development of a collaborative technical-operational protocol, structured under the Clinical–Wet–Dry model, to integrate next-generation sequencing into Ceará's health network in articulation with Fiocruz Ceará. In conclusion, the application of next-generation sequencing, when guided by a translational approach, not only substantially increases diagnostic yield but also generates a feasible, evidence-based implementation model for incorporating precision technologies into the healthcare system, with the potential to optimize clinical management and strengthen health surveillance.

Keywords: Next-generation sequencing; Clinical genomics; Clinical metagenomics; Precision medicine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplos de aplicações clínicas da metagenômica por sequenciamento de nova geração	28
Figura 2 – Desafios para implementação clínica da metagenômica por sequenciamento de nova geração.....	31
Figura 3 – Sequenciamento de nova geração pela tecnologia <i>Illumina</i>	33
Figura 4 – Fluxo bioinformático típico do sequenciamento de nova geração.....	34
Figura 5 – Fluxo de seleção das coortes genômica (psiquiátrica e neurológica) e metagenômica clínica para o sequenciamento de nova geração	40
Figura 6 – Fluxo processual da análise genômica por sequenciamento de exoma completo... <td>41</td>	41
Figura 7 – Fluxo de trabalho da análise metagenômica clínica por sequenciamento de nova geração	42
Figura 8 – Fluxograma do Protocolo técnico-operacional para metagenômica clínica no Ceará	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de detecção de microrganismos	17
Tabela 2 – Vantagens e desvantagens do sequenciamento direcionado e do <i>shotgun</i>	18
Tabela 3 – Características e principais aplicações das plataformas de sequenciamento <i>Illumina</i> e <i>Nanopore</i>	22
Tabela 4 – Distribuição percentual das variantes candidatas segundo a classificação da <i>Franklin/Genoox</i> de todos os indivíduos submetidos a sequenciamento de exoma	45
Tabela 5 – Características sociodemográficas e clínicas dos pacientes incluídos no estudo genômico do sequenciamento de exoma	47
Tabela 6 – Achados genômicos relevantes do sequenciamento de exoma das coortes psiquiátrica e neurológica investigadas	49

‘

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABN** – Academia Brasileira de Neurologia
- ACME Lab** – Laboratório Analítico de Competências Moleculares e Epidemiológicas
- AD** – Autossômica Dominante
- AR** – Autossômica Recessiva
- AT(N)** – Amiloide, Tau, Neurodegeneração
- CAAE** – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
- CCIH** – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
- CdLS** – Síndrome de Cornelia de Lange
- CZID** – Chan Zuckerberg ID
- DA** – Demência pela Doença de Alzheimer
- DFT** – Demência Frontotemporal
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- DRY** – Fluxo de trabalho bioinformático (*Dry Lab*)
- DTT** – Ditiotreitol
- DVEx** – Deep Virome Explorer
- ELA** – Esclerose Lateral Amiotrófica
- EP** – Estimativa Participativa
- Fiocruz** – Fundação Oswaldo Cruz
- GATK** – Genome Analysis Toolkit
- GUIDE** – Guidelines for the Use of Infectious Disease mNGS in the Clinical Setting
- GWAS** – Estudos de Associação Genômica Ampla
- HGF** – Hospital Geral de Fortaleza
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HPOTERM** – Termo da Ontologia do Fenótipo Humano
- HSMM** – Hospital de Saúde Mental de Messejana
- HUWC** – Hospital Universitário Walter Cantídio
- JCV** – Vírus John Cunningham
- JICA** – Japan International Cooperation Agency (Agência de Cooperação Internacional do Japão)
- LACEN** – Laboratório Central de Saúde Pública
- LCR** – Líquido Cefalorraquidiano
- LEMP** – Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

mNGS – Metagenômica por Sequenciamento de Nova Geração

LM – Leucodistrofia Metacromática

NDD – Transtorno do Neurodesenvolvimento

NfL – Neurofilamento de Cadeia Leve

NIT1-SVD – Doença de Pequenos Vasos por NIT1

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

NIID – National Institute of Infectious Diseases (Instituto Nacional de Doenças Infecciosas do Japão)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PTHS – Síndrome de Pitt-Hopkins

QC – Controle de Qualidade

RNA – Ácido Ribonucleico

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SUS – Sistema Único de Saúde

TGS – Sequenciamento de Terceira Geração

UFC – Universidade Federal do Ceará

VEP – Preditor de Efeito de Variante

VSP – Painel de Sequenciamento Viral

VUS – Variante de Significado Incerto

WES – Sequenciamento de Exoma Completo

WET – Fluxo de trabalho laboratorial (*Wet Lab*)

WGS – Sequenciamento de Genoma Completo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E DESAFIOS DIAGNÓSTICOS EM DOENÇAS NEUROINFECCIOSAS	16
2.2 O ADVENTO DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR	21
2.3 APLICAÇÕES DA GENÔMICA NA ELUCIDAÇÃO DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS	23
2.3.1 NEUROPATIAS MONOGÊNICAS E DOENÇAS RARAS	24
2.3.2 EPIGENÉTICA E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	25
2.4 APLICAÇÕES DA METAGENÔMICA CLÍNICA	27
2.4.1 DESAFIOS PARA IMPLEMENTAÇÃO DA METAGENÔMICA	29
2.5 ETAPAS PROCESSUAIS DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	32
2.5.1 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	32
2.5.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	32
2.5.3 PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA E SEQUENCIAMENTO	32
2.5.4 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	33
2.5.5 INTERPRETAÇÃO CLÍNICA INTEGRADA	35
2.6 CENÁRIO CEARENSE: LACUNAS E OPORTUNIDADES.....	35
3 JUSTIFICATIVA.....	36
4 OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5 PERCURSOS METODOLÓGICOS.....	38
5.1 TIPO DO ESTUDO	38
5.2 LOCAL DO ESTUDO.....	38
5.3 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS.....	38
5.4 FLUXOS DE TRABALHO DA ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	40
5.4.1 FLUXO DE ANÁLISE DO EXOMA.....	40
5.4.2 FLUXO DE ANÁLISE METAGENÔMICA.....	41
5.5 CONSTRUÇÃO DO PROTOCOLO TÉCNICO-OPERACIONAL	42
5.6 ASPECTOS ÉTICOS	43
6 RESULTADOS.....	45
6.1 ANÁLISE DE EXOMA: CORRELAÇÕES CLÍNICAS-GENÉTICAS	45
6.2 ANÁLISE EM METAGENÔMICA CLÍNICA	54
6.2.1 ESTUDO DE CASO: LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL PROGRESSIVA POR VÍRUS JOHN CUNNINGHAM.....	54
6.2.2 DESAFIOS OPERACIONAIS	54
6.2.3 PROTOCOLO TÉCNICO-OPERACIONAL	56
7 DISCUSSÃO	61
7.1 SÍNTESE DOS PRINCIPAIS ACHADOS	61
7.2 IMPACTO DA ANÁLISE DE EXOMA NO DIAGNÓSTICO	61
7.2.1 ELUCIDAÇÃO DIAGNÓSTICA NA COORTE NEUROLÓGICA: CASOS COM CURADORIA CLÍNICA	62
7.2.2 POTENCIAL DA ELUCIDAÇÃO NA COORTE PSIQUIÁTRICA: HIPÓTESES MOLECULARES	63
7.3 METAGENÔMICA CLÍNICA COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA ESTRATÉGICA.....	67
7.4 DA EVIDÊNCIA À PRÁTICA: DESAFIOS E SOLUÇÕES PARA IMPLEMENTAÇÃO DA METAGENÔMICA CLÍNICA NO CEARÁ	68
7.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	70

7.6 PERSPECTIVAS FUTURAS DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO E PROTOCOLOS INSTITUCIONAIS NA SAÚDE PÚBLICA BRASILEIRA.....	71
8 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A – ESTRATÉGIA DE REVISÃO DE LITERATURA	84
APÊNDICE B – ESTIMATIVA RÁPIDA: QUESTÕES NORTEADORAS	85
APÊNDICE C – RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DE EXOMA	86

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico de doenças neuropsiquiátricas e infecciosas de etiologia indefinida representa um desafio crítico para a prática clínica, especialmente no contexto do Sistema Único de Saúde (SUS). A sobreposição de sinais e sintomas, aliada à limitação dos métodos convencionais, frequentemente resulta em uma longa busca diagnóstica que agrava o quadro clínico e eleva os custos assistenciais (Gu; Miller; Chiu, 2019; Hilt; Ferrieri, 2022). O avanço das tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), aplicadas em genômica e a metagenômica, surgiu como uma solução promissora, ampliando consideravelmente o escopo e a sensibilidade da investigação etiológica (Jacob; Veeraraghavan; Vasudevan, 2019).

Embora promissoras, essas abordagens ainda são pouco incorporadas ao SUS, particularmente nas regiões Norte e Nordeste, que dispõem de menor infraestrutura laboratorial complexa e enfrentam maior dificuldade de acesso quando comparadas a outras regiões brasileiras. Especificamente no Ceará, a ausência de fluxos padronizados que articulem as unidades hospitalares aos laboratórios de referência limita o impacto dessas tecnologias na assistência e na vigilância em saúde. Essa lacuna entre o potencial tecnológico e a aplicação prática constitui o problema central abordado por esta pesquisa.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo primeiramente aplicar as estratégias de genômica e metagenômica para a elucidação de casos complexos indefinidos encaminhados por hospitais públicos de Fortaleza à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Ceará, servindo como uma prova de conceito. Em segundo lugar, e de forma central, analisar os desafios operacionais desse fluxo por meio de uma pesquisa participativa para, então, desenvolver as bases de um protocolo técnico-operacional que viabilize a implementação estruturada dessas ferramentas. A hipótese central é que a aplicação supervisionada dessas tecnologias não apenas aumenta a taxa de elucidação diagnóstica, mas também gera a evidência necessária para a construção de um modelo de implementação sustentável.

Assim, esta dissertação contribui de forma concreta para a consolidação de estratégias diagnósticas inovadoras no Ceará. Ao apresentar resultados diagnósticos de alto impacto e, a partir deles, propor as bases de protocolo de implementação baseado em dados locais, este trabalho oferece um modelo translacional que articula assistência, pesquisa e vigilância, fornecendo subsídios para a aplicação mais ampla e equitativa da genômica e metagenômica no âmbito do SUS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A construção deste referencial teórico foi baseada principalmente em um levantamento de literatura, cuja estratégia de busca principal está detalhada no Apêndice A.

2.1 Contextualização e desafios diagnósticos em doenças neuroinfecciosas

As doenças neurológicas de origem infecciosa representam parcela significativa da carga global de morbimortalidade, exigindo diagnóstico rápido e preciso para otimizar o tratamento e conter a disseminação de patógenos (Liu; Ma, 2024). Sua classificação pode seguir critérios clínicos, etiológicos e topográficos, distinguindo, por exemplo, meningites, encefalites e mielites. A diversidade de agentes etiológicos é ampla e modulada por fatores geográficos e imunológicos (Granerod et al., 2010; Nath; Smith; Thakur, 2022).

O impacto epidemiológico é expressivo: a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a meningite bacteriana cause aproximadamente 250 mil óbitos anuais e que até 2050 cerca de 13 milhões de óbitos serão atribuídos às doenças infecciosas (Dye, 2014; OMS, 2021). Já a encefalite viral, uma síndrome rara, associa-se a alta morbidade, podendo deixar sequelas físicas e cognitivas graves nos sobreviventes (Granerod et al., 2020). Contudo, a elucidação etiológica dessas doenças nem sempre é simples, sendo dificultada por sintomas inespecíficos, sobreposição clínica entre diferentes quadros e limitações dos métodos convencionais de detecção (Gu; Miller; Chiu, 2019; Hilt; Ferrieri, 2022).

Historicamente, no século XIX, o estudo de enfermidades neurológicas foi fundamentalmente baseado no método anátomo-clínico, como exemplificado pelos trabalhos de J-M Charcot (Teive et al., 2001). O advento da bacteriologia e das culturas microbiológicas, no final do século XIX e início do século XX, representou um marco no diagnóstico das doenças infecciosas, ao permitir a identificação de agentes como a *Neisseria meningitidis* no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Pereira, 2014). O diagnóstico etiológico das encefalites no início do século XXI passou a incorporar de forma sistemática métodos de alta sensibilidade, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaios sorológicos para a detecção de diversos patógenos virais (Granerod et al., 2020). Ainda assim, esses métodos dependem de hipóteses diagnósticas prévias e podem apresentar resultados falso-negativos, deixando até 50% dos casos de encefalite sem diagnóstico definido mesmo com o uso combinado de cultura, sorologia e PCR (Granerod et al., 2010; Wilson et al., 2019). A Tabela 1 mostra quais são as principais vantagens e limitações das técnicas convencionais e da metagenômica por Sequenciamento de Nova Geração (mNGS).

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de detecção de microrganismos.

Método	Vantagens	Desvantagens	Tempo de resposta
Cultura	-Baixo custo -Fácil operação -Alta especificidade -Padrão-ouro	-Operação manual -Baixa sensibilidade -Dificuldade em identificar microrganismos de difícil cultivo	-Normalmente 3–5 dias; até 1–2 semanas para microrganismos de crescimento lento (ex.: fungos e <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
Ensaio imunológico	-Operação simples -Custo relativamente baixo -Grande número de amostras em um único teste	-Baixa sensibilidade e especificidade -Reações cruzadas entre抗ígenos semelhantes -Dependência da qualidade dos anticorpos	-Algumas horas
Ensaio de PCR¹	-Alta sensibilidade -Pode ser quantitativo -Permite identificar diversos microrganismos em um único ensaio	-Alto custo -Identifica apenas microrganismos específicos -Não distingue entre organismos vivos e mortos	-Algumas horas
MALDI-TOF MS²	-Alta especificidade -Curto tempo de resposta -Baixo custo -Grande número de amostras em um único teste	-Equipamentos de alto custo -Necessidade de cultura prévia para identificação	-Alguns minutos após a cultura
mNGS³	-Detecta todos os organismos de forma não enviesada (bactérias, fungos, vírus e parasitas) -Possibilita a descoberta de novos organismos -Vantajoso para microrganismos de difícil cultivo	-Alto custo -Operação e análise de resultados complexas -Risco de contaminação -Não distingue entre organismos vivos e mortos	-24–72 horas, em média 48 horas

¹PCR: polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase);

²MALDI-TOF MS: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com tempo de voo);

³mNGS: metagenomics next-generation sequencing (metagenômica por sequenciamento de nova geração).

Fonte: adaptado de Liu, Ma, 2024.

As ferramentas laboratoriais tradicionais, embora fundamentais, mostram-se insuficientes na investigação de patógenos raros, inesperados ou presentes em baixas concentrações (Hilt; Ferrieri, 2022; Cosmosid, 2023). Nessas situações, o atraso ou a ausência de diagnóstico preciso comprometem o prognóstico, elevam custos e dificultam o controle de surtos (Liu; Ma, 2024; Gu; Miller; Chiu, 2019). Houve uma progressão nas técnicas de sequenciamento, que partiram do modelo *shotgun* e alcançaram os métodos de maior rendimento, representados pelo NGS e, em seguida, pelo de terceira geração (TGS) (Do; Dame-Teixeira, 2024).

O sequenciamento de primeira geração, descrito por Sanger e Coulson (1975) e por Maxam e Gilbert (1977), foi por muito tempo considerado o padrão-ouro, pois permitia leituras de até 1.000pb com elevada acurácia (99,99%) (Liu; Ma, 2024). No entanto, seu baixo rendimento e alto custo limitaram aplicações em larga escala (Heather; Chain, 2016; Liu; Ma, 2024).

Em 2005, a *454 Life Sciences* introduziu o sequenciamento por síntese em alta performance, seguido pelo sistema *Solexa* da *Illumina* (2006) e pelo *SOLiD* da *ABI* (2007), consolidando as tecnologias de segunda geração, conhecidas como NGS (Liu; Ma, 2024; Schatz et al., 2010). Posteriormente, a *Pacific Biosciences* lançou o *PacBio RS* em 2011, baseado na tecnologia de Sequenciamento em Tempo Real de Molécula Única, que dispensa amplificação por PCR (Liu; Ma, 2024; van Dijk et al., 2018).

Já a *Oxford Nanopore Technologies* inaugurou em 2014 a abordagem por nanoporos com o *MinION*, ampliada com as plataformas *GridION* (2017) e *PromethION* (2018, 2019) (Heather; Chain, 2016; Liu; Ma, 2024; Wang et al., 2021). A Tabela 2 demonstra as vantagens e desvantagens do sequenciamento direcionado e do *shotgun*.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens do sequenciamento direcionado e do *shotgun*.

Método	Vantagens	Desvantagens
Sequenciamento direcionado	-Grande profundidade -Maior precisão -Sequencia apenas regiões específicas: 16S rRNA ¹ , 18S para fungos e região ITS ²	-Amplificação desigual -Analisa apenas uma parte de um gene -Resolução insuficiente para identificação em nível de espécie -Impossível avaliar diretamente a função microbiana
Sequenciamento <i>Shotgun</i>	-Sequenciamento não enviesado	-Pouca sensibilidade em amostras com alto

<ul style="list-style-type: none"> -Maior resolução do conteúdo genético -Permite avaliar funções -Capaz de identificar novos organismos, genes e características genômicas 	<ul style="list-style-type: none"> <i>background</i> do hospedeiro ou baixa biomassa -Gera um conjunto de dados extenso e complexo -Risco de contaminação -Alto custo
--	---

¹rRNA: RNA ribossômico;

²ITS: espaçador interno transcrito.

Fonte: adaptado de Liu; Ma, 2024.

A introdução do NGS trouxe uma mudança de paradigma ao oferecer uma abordagem não direcionada, capaz de detectar, por meio da metagenômica, bactérias, vírus, fungos e parasitas simultaneamente em uma única corrida de sequenciamento a partir de amostras clínicas diversas como LCR, biópsias de tecido nervoso ou lavado broncoalveolar em casos com comprometimento pulmonar associado (Gu; Miller; Chiu, 2019). Diferentemente das técnicas convencionais, que dependem de hipóteses clínicas prévias e de ensaios laboratoriais específicos, a metagenômica permite a detecção de patógenos inesperados, raros ou de difícil cultivo, o que amplia o espectro de possibilidades diagnósticas (Su et al., 2024).

Estudos prospectivos reforçam a superioridade do NGS em cenários clínicos complexos. No estudo de Zhang et al. (2020), ao analisar uma coorte de pacientes com suspeita de infecção do Sistema Nervoso Central (SNC), demonstraram que a taxa de detecção global atingiu 34,45%, em contraste com apenas 7,56% dos métodos rotineiros. Especificamente, as sensibilidades foram estimadas em 85,7% para vírus, 62,5% para bactérias e 67,6% para fungos, confirmando não apenas maior amplitude diagnóstica, mas também melhor performance em casos nos quais o tratamento antimicrobiano prévio havia reduzido a sensibilidade das culturas (Zhang et al., 2020). Esses dados são consistentes com achados de outros estudos, como os de Brown, Bharucha e Breuer (2018), que também evidenciam a relevância da metagenômica na redefinição do diagnóstico de meningoencefalites de etiologia inicialmente indefinida.

Um dos aspectos mais relevantes do NGS é a capacidade da técnica de identificar agentes raros ou improváveis (Liu; Ma, 2024). Casos clínicos descritos na literatura incluem, por exemplo, a identificação de *Chlamydia psittaci* em um quadro de pneumonia grave evoluindo com sintomas neurológicos (Shi et al., 2021) O diagnóstico foi estabelecido apenas com o uso de plataformas metagenômicas, e a maior acurácia foi observada no lavado broncoalveolar, quando comparado ao sangue ou ao LCR (Shi et al., 2021). Situações semelhantes foram relatadas em infecções por vírus emergentes e fungos raros, nos quais o

arsenal convencional era incapaz de fornecer resposta diagnóstica oportuna (Wilson et al., 2019; Yang et al., 2021).

Além da positividade ampliada, outro fator de impacto clínico é o tempo de resposta (Su et al., 2024). Embora ainda não seja universalmente padronizado, o *turnaround time* do NGS em cenários clínicos varia entre 24 e 72 horas, com média em torno de 48 horas, o que já se mostra viável para influenciar decisões terapêuticas em quadros graves (Su et al., 2024). Esse tempo deve ser comparado ao de culturas fúngicas ou bacterianas específicas, que podem levar dias ou até semanas para crescimento e identificação, atrasando intervenções potencialmente salvadoras (Liu; Ma, 2024; Zhang et al., 2020).

Por outro lado, o uso do NGS não está isento de limitações. Uma das principais é o risco de contaminação ambiental ou de reagentes, que pode gerar falsos positivos se não forem empregados controles negativos e procedimentos de qualidade rigorosos (Gu; Miller; Chiu, 2019). Outra questão refere-se ao alto *background* de ácido desoxirribonucleico (DNA) humano, especialmente em amostras como o LCR, que pode reduzir a detecção de microrganismos presentes em baixa abundância (Gu; Miller; Chiu, 2019; Su et al., 2024). Para mitigar esse problema, algumas estratégias incluem a depleção prévia de DNA humano ou o uso de métodos de enriquecimento microbiano (Gu; Miller; Chiu, 2019; Su et al., 2024).

A interpretação clínica dos resultados, portanto, não pode ser dissociada da curadoria especializada e nem todo microrganismo identificado corresponde, de fato, ao agente causal do quadro clínico (Wilson et al., 2019). É essencial considerar a carga relativa de sequências, a correlação com manifestações clínicas e a necessidade de confirmação por métodos ortogonais, como PCR específica (Wilson et al., 2019). A integração de dados laboratoriais, clínicos e epidemiológicos é o que permite transformar um achado metagenômico em um diagnóstico definitivo (Wilson et al., 2019).

O impacto do NGS vai além da simples detecção. Estudos recentes mostram que a técnica pode fornecer informações adicionais, como a tipagem de cepa, a identificação de genes de resistência antimicrobiana e até a avaliação da resposta do hospedeiro a partir de perfis transcriptômicos (Gu; Miller; Chiu, 2019). Esses elementos podem orientar não apenas a conduta imediata, mas também medidas de vigilância epidemiológica e controle de surtos (Gu; Miller; Chiu, 2019).

Em biópsias neuropatológicas, a aplicação da metagenômica também mostrou utilidade significativa. Salzberg et al. (2016) relataram que, em amostras de tecido encefálico de pacientes com lesões inflamatórias de etiologia incerta, a técnica conseguiu confirmar infecções em uma fração relevante dos casos e, em outros, forneceu informações complementares que

auxiliaram na interpretação histopatológica. Esses achados ampliam o horizonte de uso do NGS, não apenas como ferramenta diagnóstica direta, mas também como suporte à prática neuropatológica.

Apesar de suas vantagens, especialistas concordam que o NGS deve ser encarada como ferramenta complementar, e não substitutiva (Su et al., 2024). O consenso é que a estratégia diagnóstica mais eficaz é aquela em camadas: métodos convencionais (sorologia, PCRs dirigidas e painéis *multiplex*) como primeira linha, especialmente em casos de alta probabilidade clínica e a metagenômica reservada para situações indeterminadas, atípicas ou refratárias (Su et al., 2024). Essa lógica de uso racional é particularmente importante no contexto de sistemas públicos de saúde, como o brasileiro, nos quais a análise de custo-efetividade se torna central para justificar a incorporação tecnológica.

2.2 O advento do Sequenciamento de Nova Geração no diagnóstico molecular

O NGS revolucionou a biomedicina ao possibilitar a análise massiva e paralela de milhões de fragmentos de DNA ou ácido ribonucleico (RNA), com maior profundidade, cobertura genômica e velocidade que o método de *Sanger*, e com custos cada vez menores (Hilt; Ferrieri, 2022).

Além de detectar variantes genéticas e rearranjos estruturais no genoma humano, o NGS permite identificar, simultaneamente, uma ampla gama de patógenos, incluindo os não previstos na hipótese diagnóstica inicial (Gu; Miller; Chiu, 2019). No campo da genômica diagnóstica, destacam-se três formatos principais: painéis gênicos direcionados, voltados a genes de interesse clínico; o sequenciamento de exoma completo (WES), que analisa as regiões codificadoras; e o sequenciamento de genoma completo (WGS), que cobre também regiões não codificadoras (Hilt; Ferrieri, 2022).

Entretanto, a aplicação mais disruptiva do NGS em doenças infecciosas é a metagenômica clínica, especialmente a mNGS, capaz de sequenciar todo o material genético presente em uma amostra, sem necessidade de hipóteses prévias (Jacob; Veeraraghavan; Vasudevan, 2019). Plataformas como *Illumina MiSeq*, *NextSeq* e *NovaSeq* se consolidaram como padrão em laboratórios clínicos pela alta precisão e capacidade de processamento (Liu; Ma, 2024).

As plataformas de sequenciamento da *Illumina* consolidaram-se como a principal tecnologia de segunda geração, sendo responsáveis por mais da metade dos estudos publicados em doenças infecciosas até 2019 (Han et al., 2019; Liu; Ma, 2024). Baseadas no princípio de

sequenciamento por síntese, utilizam nucleotídeos terminadores reversíveis associados a fluorescência e permitem alta precisão por meio da formação de *clusters* clonais (Heather; Chain, 2016; Liu; Ma, 2024). Sistemas como *iSeq 100*, *MiniSeq*, *MiSeq* e *NexSeq 550* são amplamente empregados em aplicações clínicas e de pesquisa (Heather; Chain, 2016; Liu; Ma, 2024).

O sequenciamento por nanoporo, desenvolvido pela *Oxford Nanopore Technologies*, representa uma inovação da terceira geração por possibilitar a análise de moléculas individuais de DNA ou RNA em tempo real, sem necessidade de amplificação por PCR (Liu; Ma, 2024). Plataformas como *MinION*, *GridION* e *PromethION* destacam-se pela portabilidade e rapidez na geração de dados, além da capacidade de identificar modificações de bases, como metilação e tais características já foram aplicadas em contextos de vigilância epidemiológica, incluindo surtos de Ebola e Zika (Quick et al., 2016; Faria et al., 2017; Broughton et al., 2020; Wang et al., 2021; Liu; Ma, 2024). Apesar do potencial, limitações como o custo elevado e maior taxa de erro ainda restringem seu uso clínico (Liu; Ma, 2024). A Tabela 3 mostra as características e principais aplicações dessas plataformas de sequenciamento.

Tabela 3. Características e principais aplicações das plataformas de sequenciamento *Illumina* e *Nanopore*.

Plataforma	Características e Principais aplicações
<i>Illumina iSeq 100</i>	Tempo de execução entre 9,5 e 19 horas, com capacidade máxima de até 24 milhões de leituras por corrida e comprimento de leitura de 2 x 150pb. É voltado principalmente para o sequenciamento de genomas pequenos de microrganismos e vírus, bem como para painéis de genes-alvo
<i>Illumina MiniSeq</i>	Realiza corridas em 4 a 24 horas, com rendimento de até 25 milhões de leituras por execução e comprimento máximo de 2 x 150pb ou 2 x 300pb. É utilizado em genomas pequenos, metagenômica 16S, sequenciamento de genes-alvo e perfil de expressão gênica
<i>Illumina MiSeq</i>	Possui tempo de execução de 4 a 55 horas, produz até 25 milhões de leituras por corrida e permite leituras de até 2 x 300 pb. É amplamente empregado no sequenciamento de genomas microbianos, genes-alvo e em análises de metagenômica 16S
<i>Illumina NextSeq 550</i>	Executa corridas entre 12 e 30 horas, com capacidade de até 400 milhões de leituras e tamanho máximo de 2 x 150pb. É indicado para sequenciamento de exomas, genes-alvo, transcriptomas completos e análises citogenômicas
<i>Illumina NextSeq 1000&2000</i>	Realizam sequenciamento em 11 a 48 horas, alcançando até 1.200 milhões de leituras por execução, com comprimento de até 2 x 150 pb. São utilizados em genomas pequenos, exomas e painéis ampliados, perfil de célula única, transcriptomas e análises de microRNAs e pequenos RNAs
<i>Nanopore MinION</i>	Plataforma portátil, capaz de gerar até 50 Gb de dados por <i>flowcell</i> em corridas de até 72 horas a 420 bases/s. Permite sequenciamento em tempo real, com transmissão imediata dos dados e análise rápida. Destaca-se pela

	flexibilidade no comprimento das leituras, que variam de fragmentos curtos a ultra-longos (>4 Mb), ampliando a aplicabilidade experimental
Nanopore GridION	Possui capacidade para operar até cinco <i>flowcells</i> de forma independente (<i>Flongle</i> ou <i>MinION</i>), alcançando rendimentos de até 250 Gb de dados transmitidos em tempo real. Conta com sistema integrado de computação e análise, reduzindo a necessidade de infraestrutura de tecnologia de informação. Sua configuração compacta e de baixo custo de capital torna-o acessível para diferentes laboratórios
Nanopore PromethION	Voltada para sequenciamento de larga escala, permite o uso de até 48 <i>flowcells</i> de alta capacidade de forma independente. Oferece ultra-alto rendimento, capaz de gerar <i>terabytes</i> de dados em tempo real. Destina-se a aplicações populacionais, como sequenciamento de genomas humanos, com custo estimado a partir de US\$ 720 por genoma, considerando consumíveis e instrumentação. Assim como os demais sistemas da <i>Oxford</i> , não exige investimento inicial em equipamento, sendo os custos restritos a insumos de uso contínuo.

Fonte: adaptado de Liu, Ma, 2024.

2.3 Aplicações da genômica na elucidação de doenças neurológicas

2.3.1 Neuropatias monogênicas e doenças raras

O campo da genômica diagnóstica tem desempenhado um papel transformador na investigação de doenças neuropsiquiátricas raras e complexas, sobretudo naquelas em que os métodos convencionais não são capazes de fornecer respostas etiológicas consistentes. Neuropatias hereditárias, epilepsias refratárias e síndromes de origem indefinida representam um grupo de condições em que a aplicação de técnicas de exoma clínico e genoma completo ampliou significativamente a taxa de diagnóstico, impactando diretamente o manejo clínico, o aconselhamento genético e a coordenação do cuidado (Liu et al., 2019).

No caso das epilepsias genéticas, por exemplo, o emprego do NGS tem permitido identificar variantes associadas a canais iônicos e proteínas sinápticas, que não seriam detectáveis por exames convencionais de imagem ou neurofisiologia. Krey et al. (2022) destacam que o exoma clínico aumentou a taxa de diagnóstico em pacientes com epilepsias precoces em até 40%, permitindo não apenas o reconhecimento etiológico, mas também ajustes terapêuticos específicos, como a introdução de fármacos moduladores de canais de sódio em pacientes com mutações em *SCN1A* ou a contraindicação de determinados anticonvulsivantes. Essa capacidade de orientar condutas farmacológicas ilustra o impacto translacional direto da genômica na prática clínica.

Outro exemplo relevante é a *Cornelia de Lange Syndrome* (CdLS), uma condição rara associada a defeitos nos genes da coesina, como *NIPBL*, *SMC1A* e *HDAC8*. Estudos recentes

de Di Nardo, Krantz e Musio (2024) demonstraram que essas variantes estão relacionadas a instabilidade genômica, estresse oxidativo elevado e senescência celular precoce, revelando potenciais biomarcadores celulares para diagnóstico e monitoramento.

Já Kaur et al. (2023), ao analisar mais de 700 probandos, reforçaram que mutações em *NIPBL* respondem por mais de 60% dos casos, enquanto genes adicionais, como *BRD4* e *EP300*, estão associados a fenótipos mais brandos. Esses achados evidenciam a complexidade genotípica da síndrome e ressaltam a importância do sequenciamento como ferramenta de precisão diagnóstica.

Estudos de abordagem genômica em coortes com doenças raras de difícil elucidação mostraram que o WES é capaz de fornecer um diagnóstico definitivo em uma proporção significativa dos casos, impactando diretamente o manejo clínico e encerrando longas jornadas de investigação para as famílias (Liu et al., 2019). Essa perspectiva de diagnóstico em tempo reduzido é ainda mais relevante considerando que algumas terapias gênicas já estão disponíveis e sua eficácia depende do início precoce.

Além do valor etiológico, a genômica tem permitido avanços em diagnósticos diferenciais em condições de apresentação clínica semelhante. Em neuropatias periféricas, por exemplo, o exoma tem contribuído para distinguir formas hereditárias de formas adquiridas, o que evita tratamentos desnecessários ou ineficazes. De igual modo, em doenças retinianas, o sequenciamento possibilitou redefinir diagnósticos clínicos prévios, identificando variantes em genes como *RHO* e *RPGR*, que não haviam sido previamente reconhecidas (Diñeiro et al., 2020).

Um aspecto particularmente relevante, evidenciado em trabalhos recentes, é que o diagnóstico genômico não deve ser entendido como um ato isolado, mas como parte de uma estratégia integrada de coordenação do cuidado. Kammermeier et al. (2023) argumentam que a incorporação de resultados genômicos precisa estar vinculada a fluxos clínicos organizados, nos quais equipes multidisciplinares avaliem não apenas a etiologia, mas também as implicações terapêuticas, prognósticas e psicossociais. Isso inclui o aconselhamento genético familiar, o planejamento reprodutivo e a integração com serviços de apoio social e educacional (Kammermeier et al., 2023). É nesse contexto que a proposta desta dissertação de desenvolver as bases de um fluxo-protocolo Fiocruz–hospitais dialoga diretamente com as recomendações internacionais, ao enfatizar a importância de integrar laboratórios de referência a serviços assistenciais de alta complexidade.

É necessário reconhecer, contudo, as limitações ainda presentes na aplicação da genômica diagnóstica em doenças neurológicas e neuropsiquiátricas raras. Primeiramente, a

interpretação de variantes que apresentam significado incerto continua sendo um desafio recorrente, exigindo bancos de dados populacionais mais robustos e estratégias de reclassificação contínua à medida que novas evidências emergem (Liu et al., 2019). Além disso, o custo do sequenciamento integral, embora em queda, ainda constitui barreira para implementação universal em países de baixa e média renda, o que demanda políticas públicas de financiamento e priorização (Liu et al., 2019).

Em síntese, os avanços recentes demonstram que a genômica diagnóstica em neuropsiquiatria e quadros monogênicos e síndromes raras transcende o papel de identificar a mutação causal. Seu valor está em redefinir o percurso clínico desses pacientes, encurtando o tempo até o diagnóstico, evitando tratamentos inadequados e possibilitando acesso a terapias específicas ou experimentais. No contexto brasileiro, sua integração em protocolos institucionais, como o que se propõe neste estudo, pode representar um marco no enfrentamento das doenças neuropsiquiátricas de difícil diagnóstico, especialmente quando articulada a redes de referência como a Fiocruz Ceará.

2.3.2 Epigenética e doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas, em especial a Doença de Alzheimer (DA), representam um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI. Além do impacto epidemiológico crescente, estimulado pelo envelhecimento populacional, o diagnóstico clínico e laboratorial dessas condições ainda é marcado por limitações, principalmente nas fases iniciais, quando os sintomas neuropsiquiátricos podem se confundir com processos de envelhecimento fisiológico ou com outras formas de demência (Perkovic et al., 2021). Nesse cenário, a integração entre biomarcadores genômicos, epigenéticos e proteicos tem sido proposta como caminho para melhorar a acurácia diagnóstica e possibilitar o monitoramento da neurodegeneração.

A contribuição da genômica para o entendimento da DA é reconhecida há décadas, desde a identificação de mutações em *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*, associadas às formas familiares da doença (Bryzgalov et al., 2023). No entanto, essas variantes explicam apenas uma pequena fração dos casos, e sua presença se concentra em populações restritas (Bryzgalov et al., 2023). Estudos de associação genômica ampla (GWAS) ampliaram esse espectro, identificando *loci* como *APOE*, *CLU* e *TREM2*, relacionados ao risco aumentado de desenvolvimento da doença, embora com penetrância variável (Bryzgalov et al., 2023). Assim, o foco mais recente tem se deslocado para mecanismos epigenéticos como metilação do DNA, modificações de histonas e

regulação por microRNAs, que parecem mediar a interação entre predisposição genética e fatores ambientais.

A epigenômica desponta, portanto, como elo crítico na compreensão das demências. Trabalhos como o de Bryzgalov et al. (2023) demonstraram que Polimorfismos de Nucleotídeo Únicos (SNPs) regulatórios podem influenciar o perfil de metilação do DNA em genes associados à DA, como *ARID1B* e *HDAC4*, reforçando a hipótese de que alterações epigenéticas precedem as manifestações clínicas. A discussão em "*Epigenetics of Alzheimer's Disease*" de Perkovic e colaboradores (2021) cita um estudo que identificou assinaturas de metilação diferencial em neurônios do hipocampo de indivíduos com Alzheimer, reforçando essa hipótese.

No Brasil, o diagnóstico da DA tem evoluído em alinhamento com as diretrizes internacionais. O Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia (ABN) publicou recomendações recentes que incorporam o uso de biomarcadores segundo o *framework* biológico AT(N), que classifica os achados em patologia Amiloide (A), Tau (T) e Neurodegeneração (N) (Schilling et al., 2022; Studart-neto et al., 2024). As diretrizes validam o uso de marcadores clássicos no LCR, como a $A\beta42$ e a tau fosforilada (p-tau), e incluem explicitamente o Neurofilamento de Cadeia Leve (NfL) como um marcador de neurodegeneração (N) (Studart-neto et al., 2024).

Notavelmente, o novo consenso também abre caminho para o uso de biomarcadores plasmáticos como ferramentas de triagem, refletindo um avanço significativo em direção a métodos menos invasivos (Studart-neto et al., 2024). Embora a epigenômica ainda não esteja incorporada a essas recomendações clínicas, os avanços recentes sugerem que perfis de metilação e expressão de microRNAs poderão, em breve, complementar o painel de biomarcadores AT(N), sobretudo quando aliados a tecnologias de NGS.

Outro ponto de destaque é a relação entre instabilidade genômica e envelhecimento celular em determinadas síndromes genéticas, como o caso já mencionado anteriormente de CdLS que já demonstraram associação entre defeitos em proteínas da coesina, acúmulo de DNA danificado e envelhecimento precoce de células neuronais (Di Nardo; Krantz; Musio, 2024).

A integração clínica desses achados, entretanto, ainda apresenta desafios. De um lado, há grande heterogeneidade interindividual nos perfis epigenéticos, modulada por fatores ambientais como dieta, estresse oxidativo e exposição a poluentes (Di Nardo; Krantz; Musio, 2024). De outro, a transposição das descobertas de laboratório para a prática clínica exige validação em coortes populacionais amplas e diversificadas, algo ainda incipiente em países de baixa e média renda. No entanto, experiências internacionais já têm apontado para o uso da

epigenômica como ferramenta de estratificação prognóstica, identificando subgrupos de pacientes com maior risco de progressão rápida, o que pode auxiliar na seleção de terapias modificadoras da doença em desenvolvimento (Perkovic et al., 2021).

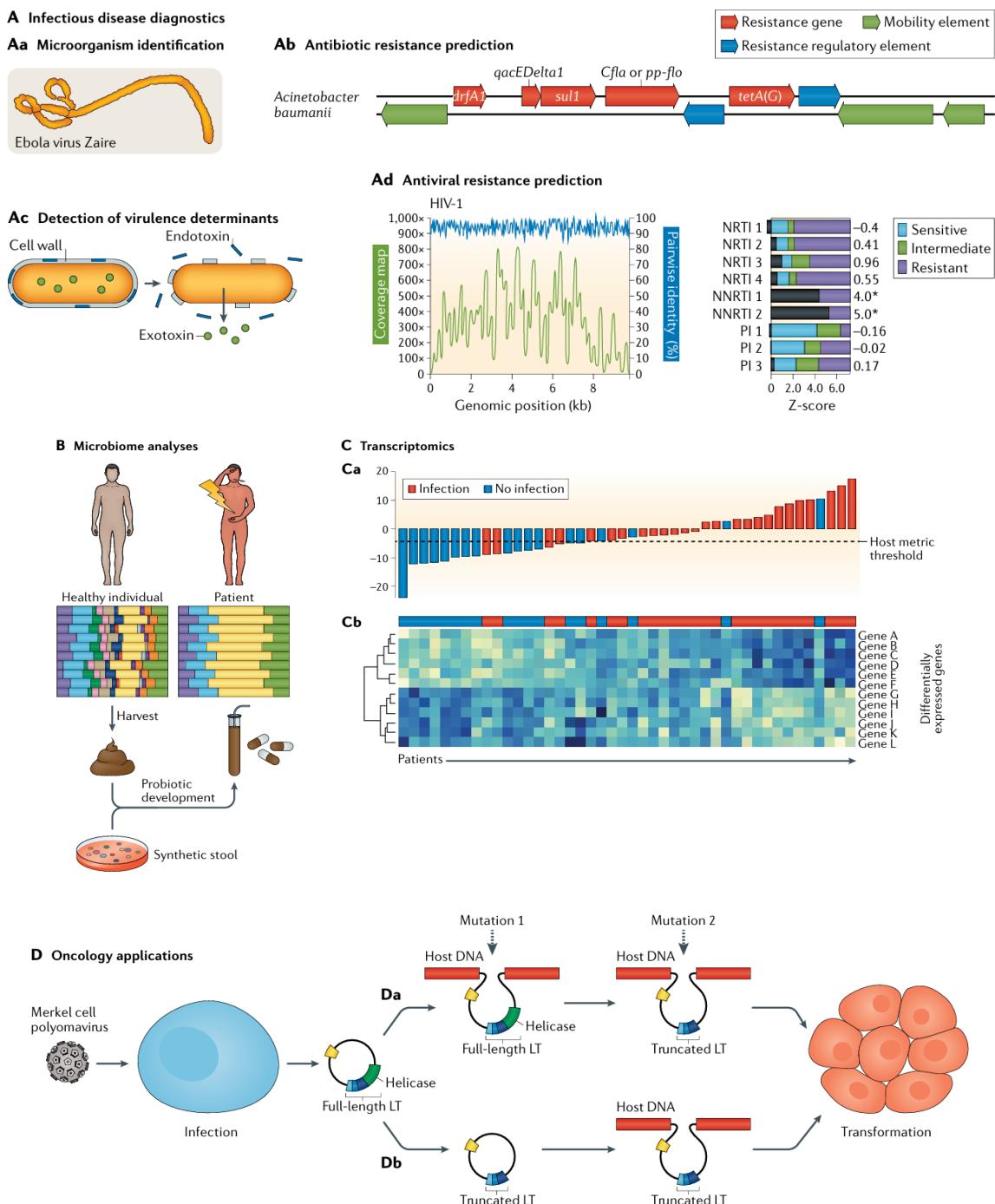
Por fim, é fundamental destacar que a incorporação desses avanços no Brasil depende de iniciativas institucionais como o *Programa Genomas Brasil* (Brasil, 2020), que prevê a implementação de plataformas de sequenciamento em rede e a capacitação de recursos humanos especializados. A articulação entre tais programas e projetos acadêmicos poderia acelerar a translação do conhecimento epigenético e genômico para a prática clínica, reduzindo o hiato entre descobertas científicas e cuidados em saúde.

2.4 Aplicações da metagenômica clínica

A mNGS tem ampliado seu papel na prática clínica ao permitir a detecção não enviesada de bactérias, vírus, fungos e parasitas em diferentes amostras biológicas, incluindo LCR, sangue e tecidos (Liu; Ma, 2024). Sua utilidade é evidente em situações de etiologia indefinida, infecções oportunistas e surtos hospitalares (Gu; Miller; Chiu, 2019; Liu; Ma, 2024). Além da identificação do patógeno, a mNGS possibilita análises complementares, como tipagem genômica, vigilância epidemiológica e monitoramento de resistência antimicrobiana (Hilt; Ferrieri, 2022).

Em infecções do SNC, a mNGS demonstrou maior taxa de detecção em comparação a métodos tradicionais, chegando a sensibilidades superiores a 70% em meningite criptocócica e aspergilose cerebral (Miller et al., 2019; Xing et al., 2020; Liu; Ma, 2024). Em infecções respiratórias, mostrou-se mais sensível que a cultura convencional e útil na identificação de patógenos atípicos ou de difícil cultivo (Huang et al., 2020; Mu et al., 2021; Liu; Ma, 2024). Na sepse, a análise de DNA livre circulante revelou-se promissora para acelerar o diagnóstico e orientar condutas terapêuticas (Blauwkamp et al., 2019; Jing et al., 2021; Liu; Ma, 2024). Ainda que em estágio inicial, aplicações em infecções oculares sugerem que a mNGS pode contribuir na elucidação de casos sem agente identificado, sobretudo envolvendo organismos raros (Gao et al., 2016; Liu; Ma, 2024; Parekh et al., 2020). A Figura 1 ilustra aplicações clínicas dessa tecnologia.

Figura 1. Exemplos de aplicações clínicas do sequenciamento metagenômico de nova geração



(A) Diagnóstico de doenças infecciosas: identificação direta de patógenos, predição de resistência antimicrobiana e de fatores de virulência. (B) Estudos de microbioma: avaliação prognóstica e desenvolvimento de terapias probióticas, como no tratamento de *Clostridium difficile*. (C) Transcriptômica: diferenciação entre pacientes infectados e não infectados por perfis de resposta do hospedeiro. (D) Oncologia: detecção de vírus oncogênicos e mutações genômicas associadas à tumorigênese.

Fonte: Chiu; Miller, 2019.

Do ponto de vista internacional, observa-se uma expansão gradual da tecnologia: nos Estados Unidos da América, a *Precision Medicine Initiative* e redes laboratoriais integradas

favoreceram a adoção do NGS e no Japão diretrizes nacionais já normatizam o uso da mNGS em infecções de causa desconhecida (Hilt; Ferrieri, 2022; Gu; Miller; Chiu, 2019; Liu; Ma, 2024). No Brasil, o *Programa Nacional de Genômica e Saúde de Precisão – Genomas Brasil* representa um avanço importante, embora a aplicação clínica ainda esteja restrita a centros de pesquisa e hospitais universitários, com baixa integração efetiva ao SUS (Brasil, 2020).

2.4.1 Desafios para implementação da metagenômica

A incorporação da mNGS na prática clínica enfrenta múltiplos obstáculos de ordem técnica, logística e econômica (Liu; Ma, 2024). O alto custo, a necessidade de infraestrutura laboratorial especializada e a complexidade das análises bioinformáticas ainda restringem sua adoção em larga escala, sobretudo em países de renda média (Liu; Ma, 2024).

Entre os principais desafios técnicos, destaca-se a alta proporção de DNA humano em amostras clínicas, o que pode dificultar a detecção de patógenos quando a carga microbiana é baixa (Liu; Ma, 2024). Em amostras de LCR de pacientes com encefalite, por exemplo, entre 97% e 99% das sequências podem corresponder ao hospedeiro, reduzindo significativamente a sensibilidade do método (Liu; Ma, 2024; Wilson et al., 2018). Estratégias de depleção mostraram-se eficazes na redução do DNA humano, mas podem também impactar negativamente na preservação de ácidos nucleicos virais ou bacterianos, exigindo validação criteriosa antes da aplicação (Hasan et al., 2016; Nelson et al., 2019; Liu; Ma, 2024). Nesse contexto, a profundidade de sequenciamento é um fator relevante, sendo estimado que cerca de 20 milhões de leituras ofereçam um equilíbrio entre custo e eficiência na detecção de patógenos (Liu et al., 2021; Liu; Ma, 2024).

Outro ponto crítico refere-se à padronização e validação laboratorial. Ao contrário dos métodos convencionais, que contam com protocolos consolidados, a mNGS ainda carece de referências universais, bancos de dados uniformizados e métricas robustas de controle de qualidade (Liu; Ma, 2024). Iniciativas já demonstraram a viabilidade de ensaios clínicos validados, como o estudo de Miller e colaboradores (2019), que aplicou a mNGS para o diagnóstico de meningite e encefalite em laboratório de microbiologia licenciado, reforçando o potencial de sua implementação progressiva em contextos clínicos.

Além disso, a interpretação clínica dos resultados constitui um dos maiores desafios (Liu; Ma, 2024). Diferentemente dos testes tradicionais, que fornecem respostas objetivas, a mNGS gera grandes volumes de dados não enviesados, exigindo *pipelines* bioinformáticos sofisticados e especialistas capazes de diferenciar infecção, colonização ou contaminação (Liu;

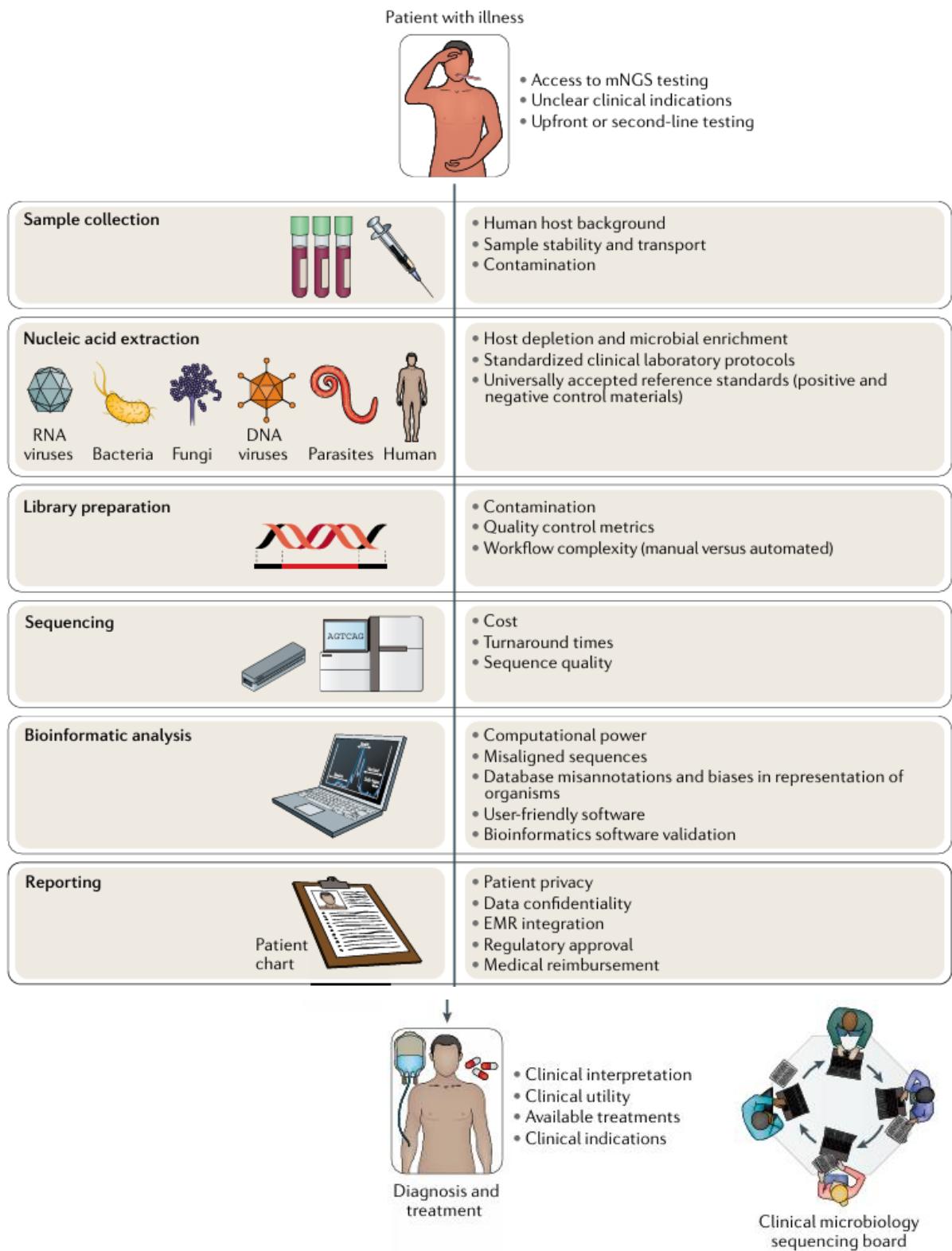
Ma, 2024). Para evitar interpretações equivocadas, recomenda-se que os relatórios envolvam equipes multidisciplinares, incluindo microbiologistas clínicos, infectologistas e médicos assistentes (Miller et al., 2019; Liu; Ma, 2024).

Por fim, o custo permanece como uma barreira relevante, com gasto por amostra superior ao de métodos convencionais. Estima-se que o sequenciamento de fezes humanas demande entre 6 e 9 GB de dados (Liu et al., 2021), além de custos consideráveis para reagentes e custos de pessoal (Gu et al., 2021). Apesar disso, análises econômicas sugerem que a mNGS pode ser custo-efetivo em cenários específicos, como na prevenção de hospitalizações em pacientes com cirrose (Bajaj et al., 2020; Liu; Ma, 2024).

Assim, embora a mNGS represente uma tecnologia promissora para o diagnóstico de infecções complexas e de difícil elucidação, sua implementação clínica requer avanços em padronização, acessibilidade financeira e treinamento de profissionais especializados (Liu; Ma, 2024).

Cada etapa desde a coleta da amostra até a análise e o relatório envolve potenciais limitações, como contaminação, custo, tempo de processamento, qualidade da sequência, necessidade de protocolos padronizados, poder computacional, vieses de base de dados, integração ao prontuário eletrônico, privacidade e regulação (Chiu; Miller, 2019). A interpretação clínica deve ocorrer em conjunto com um comitê multidisciplinar formado para discutir, interpretar e orientar o uso de resultados de sequenciamento metagenômico no contexto clínico (Chiu; Miller, 2019). A Figura 2 ilustra os principais desafios para a implementação clínica dessa tecnologia.

Figura 2. Desafios para implementação clínica do sequenciamento metagenômico.



Fonte: Chiu; Miller, 2019.

2.5 Etapas processuais do Sequenciamento de Nova Geração

A aplicação do NGS para fins diagnósticos clínicos segue um fluxo de trabalho estruturado, que compreende etapas laboratoriais (experimentos úmidos) e análises computacionais (experimentos secos). A execução precisa de cada fase é fundamental para garantir a validade e a confiabilidade dos resultados.

2.5.1 Coleta e processamento de amostras

A etapa inicial, e crucial, é a coleta de amostras clínicas, que podem incluir sangue, urina, líquido broncoalveolar, LCR e tecidos (Cosmosid, 2023; Chiu; Miller, 2019). A qualidade do material obtido é determinante para o sucesso da análise. O transporte rápido e o processamento adequado das amostras são essenciais para evitar a degradação dos ácidos nucleicos, especialmente os de vírus de RNA (Liu; Ma, 2024). Procedimentos como centrifugação de amostras de sangue para coleta de plasma e liquefação de escarro com ditiotreitol (DTT) e/ou protease K são realizados para otimizar a extração e a detecção de patógenos (Liu; Ma, 2024).

2.5.2 Extração de ácidos nucleicos

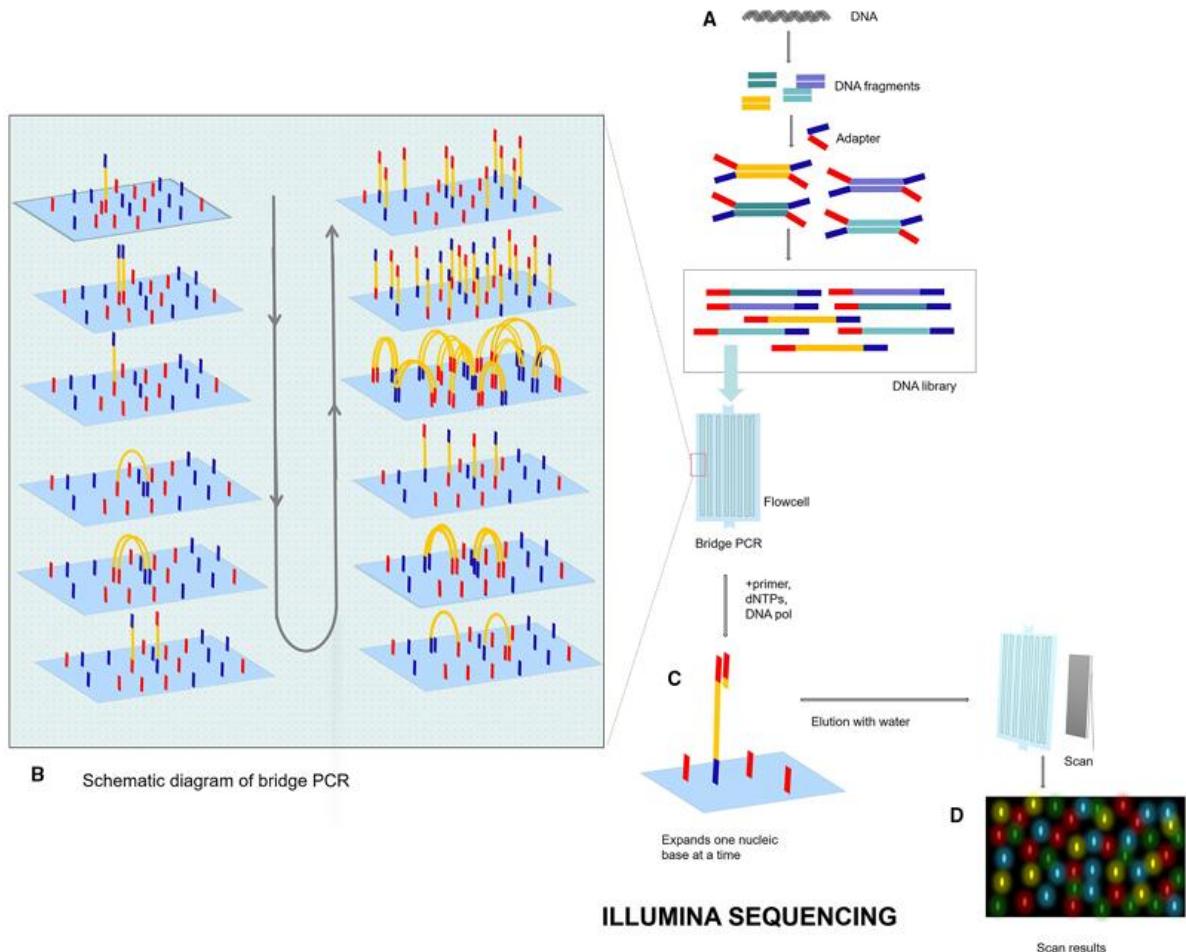
Nesta fase, todo o material genético presente na amostra – tanto de origem humana quanto microbiana (bactérias, vírus, fungos e parasitas) – é extraído (Thomas et al., 2012). A extração de alta qualidade é um fator-chave para as etapas subsequentes, como a preparação da biblioteca e o sequenciamento. É crucial considerar que, em amostras clínicas, a maior parte do ácido nucleico é de origem humana (Thomas et al., 2012). Para evitar que esse material genético comopleque a análise de bioinformática e reduza a precisão dos resultados, métodos laboratoriais como lise diferencial e captura por sonda podem ser empregados para remover o DNA do hospedeiro antes do sequenciamento, especialmente em amostras com alta biomassa de hospedeiro (>90%) (Thomas et al., 2012).

2.5.3 Preparação da biblioteca e sequenciamento

Após a extração, o material genético é processado para a construção da biblioteca. Este procedimento envolve a fragmentação dos ácidos nucleicos e a adição de adaptadores específicos, permitindo a compatibilidade com as plataformas de NGS. Posteriormente, o material é submetido a tecnologias de alto rendimento, como as plataformas *Illumina* (*MiSeq*,

NextSeq, NovaSeq), que são amplamente reconhecidas pela sua alta precisão e capacidade de processamento (Hilt; Ferrieri, 2022). Vale ressaltar que a esterilidade em todas as etapas de laboratório é crítica, pois pequenas quantidades de material genético exógeno podem levar a resultados falso-positivos, especialmente em amostras de baixa biomassa (Salter et al., 2014; Strong et al., 2014). A Figura 3 esquematiza o sequenciamento pela tecnologia da Illumina.

Figura 3. Sequenciamento de nova geração pela tecnologia Illumina.



- (A) Construção da biblioteca de DNA com fragmentação, adição de adaptadores e fixação no *flowcell*.
 - (B) PCR em ponte para amplificação em *clusters*.
 - (C) Sequenciamento por síntese (SBS) com incorporação controlada de dNTPs fluorescentes e leitura cíclica.
 - (D) Detecção dos sinais fluorescentes.
- Fonte: Zhang et al., 2021.

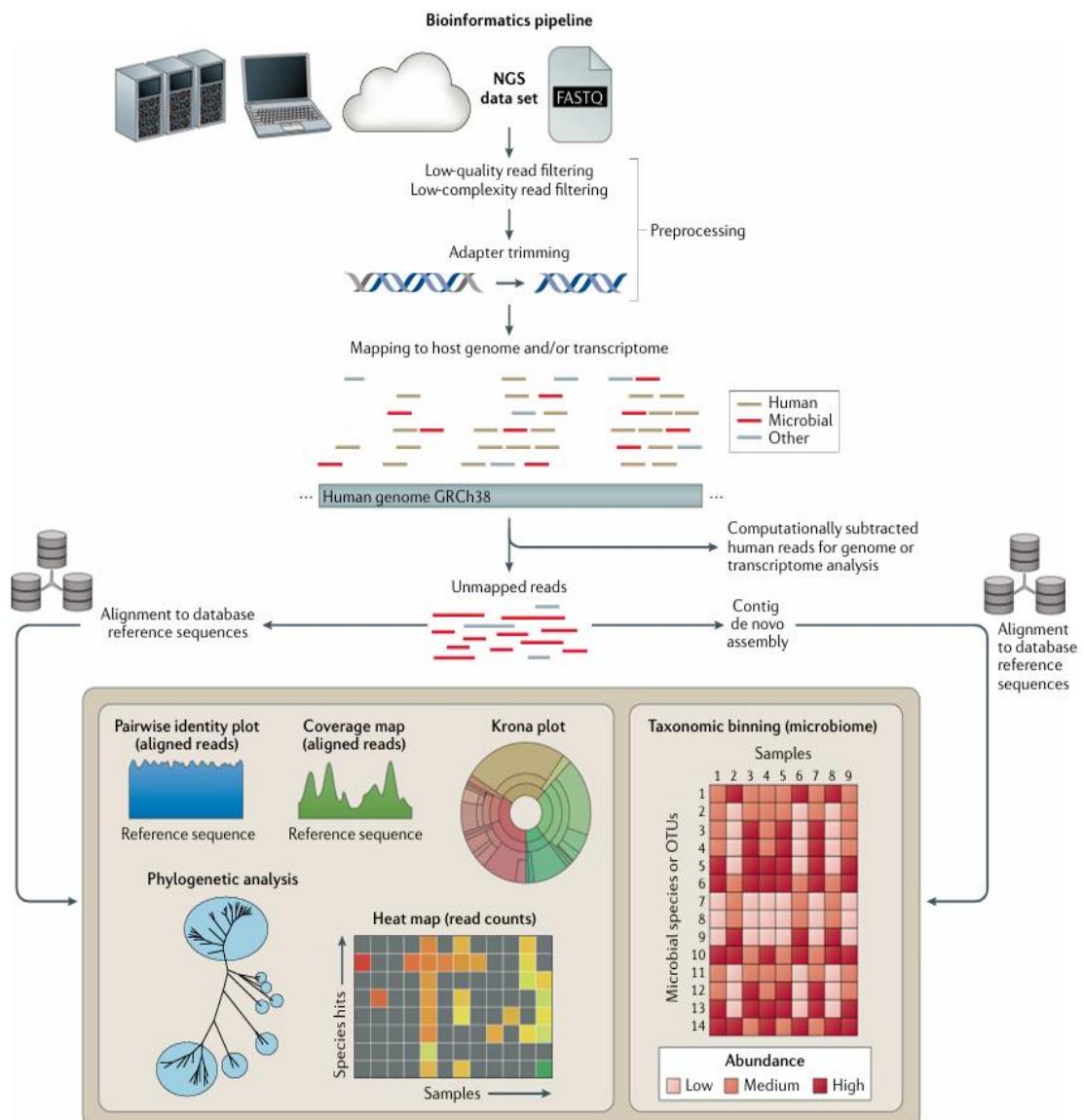
2.5.4 Análise de bioinformática

A análise bioinformática, também conhecida como "experimentação seca", é a etapa crucial para a interpretação dos dados brutos de sequenciamento. Usando fluxos de trabalho (*pipelines*) personalizados, o material genético é processado para filtrar sequências de baixa qualidade e remover as de origem humana (Naccache et al., 2014; Flygare et al., 2016). Em

seguida, as sequências restantes são alinhadas a bancos de dados de referência para a identificação dos microrganismos presentes na amostra, o que tradicionalmente exige uma equipe altamente treinada (Naccache et al., 2014), embora soluções como portais interativos de análise busquem simplificar o processo para pessoal laboratorial qualificado (Flygare et al., 2016).

A Figura 4 ilustra um fluxo bioinformático típico do NGS: os dados passam por pré-processamento, remoção de DNA do hospedeiro, alinhamento ou montagem *de novo* em bancos de referência e classificação taxonômica, com visualização em mapas de cobertura, *Krona plots*, análises filogenéticas e *heat maps* (Chiu; Miller, 2019).

Figura 4. Fluxo bioinformático típico do sequenciamento de nova geração.



Fonte: adaptado de Chiu; Miller, 2019.

2.5.5 Interpretação clínica integrada

A etapa final consiste na interpretação dos resultados do NGS em conjunto com a equipe clínica (Gu et al., 2019; Liu; Ma, 2024). Como a tecnologia detecta microrganismos de forma imparcial, é essencial distinguir patógenos estritamente de microrganismos oportunistas ou comensais (Chiang; Dekker, 2020). É fundamental contextualizar os achados laboratoriais com o quadro clínico do paciente, incluindo sintomas, dados de imagem, resultados de testes convencionais (cultura e PCR) e o estado imunológico (por exemplo, imunodeficiência) (Gu et al., 2019; Liu; Ma, 2024). A padronização de protocolos de controle de qualidade e a colaboração entre as equipes são cruciais para consolidar o NGS como uma ferramenta segura e confiável na microbiologia clínica (Gu et al., 2019; Liu; Ma, 2024).

2.6 Cenário cearense: lacunas e oportunidades

A Fiocruz Ceará dispõe de infraestrutura e experiência para realizar NGS em casos complexos, mas carece de protocolo formal que integre hospitais públicos a esse serviço. Um fluxo técnico-operacional compartilhado poderia padronizar indicações, otimizar logística de amostras, garantir devolutiva estruturada e integrar dados à vigilância em saúde, alinhando-se às políticas de fortalecimento do diagnóstico de alta complexidade no SUS.

O avanço das tecnologias de terceira geração, como *Nanopore* e *PacBio*, promete ampliar a rapidez e a portabilidade do sequenciamento, permitindo diagnósticos à beira-leito (Liu; Ma, 2024). A integração de inteligência artificial e aprendizado de máquina aos *pipelines* bioinformáticos tende a acelerar a interpretação de dados e aumentar a sensibilidade na detecção de patógenos (Liu; Ma, 2024). No contexto brasileiro e cearense, a criação de redes colaborativas de diagnóstico genômico-metagenômico e a capacitação de profissionais podem transformar o NGS de ferramenta de pesquisa em instrumento cotidiano da prática clínica.

3 JUSTIFICATIVA

A relevância deste trabalho manifesta-se em três dimensões interligadas que conectam a necessidade do paciente à estratégia de saúde pública. A primeira é a dimensão clínica, que busca solucionar a longa "odisseia diagnóstica" enfrentada por pacientes com doenças neuropsiquiátricas raras ou infecções complexas no SUS, visando reduzir atrasos terapêuticos e melhorar o prognóstico.

A segunda é a dimensão científica, que preenche uma lacuna ao gerar dados inéditos sobre a aplicação, os desafios e o rendimento diagnóstico de tecnologias de NGS no contexto específico do Nordeste brasileiro e cearense. Finalmente, a dimensão estratégica oferece a contribuição mais pragmática do estudo: a proposição das bases de um protocolo técnico-operacional baseado em evidências locais, que viabiliza o uso da tecnologia e oferece um modelo de implementação replicável para a saúde pública.

O uso de tecnologias NGS tem o potencial de fornecer diagnósticos mais rápidos e precisos, orientando condutas e alterando desfechos (Hilt; Ferrieri, 2022). No entanto, sob a ótica científica, há uma lacuna de dados sobre a aplicação, os desafios e o rendimento diagnóstico dessas tecnologias no contexto específico do Nordeste brasileiro e cearense.

Este estudo justifica-se, portanto, por gerar dados inéditos e necessários sobre o uso da genômica e metagenômica no Ceará, pois não basta possuir a tecnologia, é preciso viabilizar seu uso. Assim, este trabalho baseado em evidências locais oferece as bases de um modelo de implementação que pode ser replicado em outros cenários do SUS e que dialoga com as políticas nacionais de inovação e vigilância em saúde.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta pesquisa é o de avaliar as aplicações clínicas do NGS em abordagens genômicas e metagenômicas realizadas na Fiocruz Ceará em casos clínicos complexos oriundos da Atenção Terciária de Fortaleza.

4.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

1. Analisar os achados do sequenciamento de exoma em coorte de pacientes com quadros neurológicos e psiquiátricos complexos, visando a identificação de variantes genéticas candidatas à elucidação etiológica;
2. Avaliar a utilidade clínica do mNGS na investigação de caso de neuroinfecção não elucidado por métodos convencionais;
3. Mapear os principais desafios operacionais no fluxo diagnóstico envolvendo mNGS, por meio da análise participativa com a equipe técnica multiprofissional;
4. Desenvolver as bases de um protocolo técnico-operacional colaborativo para o fluxo de diagnóstico por metagenômica clínica no Ceará, integrando as dimensões clínica, laboratorial e bioinformática.

5 PERCURSOS METODOLÓGICOS

5.1 Tipo do estudo

Trata-se de uma pesquisa de natureza translacional e aplicada, com abordagem mista (qualitativa e quantitativa). O desenho do estudo combina uma análise de coorte retrospectiva (para genômica) e um estudo de caso (para metagenômica) com uma vertente de pesquisa operacional. A frente quantitativa, de caráter observacional e descritivo, consistiu na análise de casos clínicos complexos por meio de duas abordagens de NGS: a genômica, por WES para a identificação de variantes genéticas candidatas à elucidação diagnóstica; e a metagenômica, para a identificação etiológica em casos de infecção sem diagnóstico confirmado por métodos convencionais. A frente qualitativa, de natureza exploratória, centrou-se no mapeamento de desafios operacionais e no desenvolvimento de um protocolo técnico-operacional para o uso da metagenômica clínica no SUS do Ceará, fundamentado em uma análise participativa com a equipe técnica.

5.2 Local do estudo

As análises laboratoriais (*wet lab*) e de bioinformática (*dry lab*) foram centralizadas na Fiocruz Ceará. A seleção dos casos clínicos e a coleta das amostras ocorreram em unidades hospitalares de atenção terciária de Fortaleza, estabelecidas como parceiras da pesquisa, incluindo o Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), o Hospital de Saúde Mental de Messejana (HSMM) e o Hospital Geral de Fortaleza (HGF).

5.3 Seleção e caracterização dos casos clínicos

Este estudo foi conduzido com amostras encaminhadas a partir de casos clínicos complexos de unidades de Atenção Terciária à Saúde de Fortaleza (HUWC; HGF; HSMM). As amostras para análise metagenômica foram de conveniência, enquanto as para análise genômica partiram de um chamamento da Fiocruz Ceará para casos clínicos de base monogênica.

A coleta das amostras biológicas foi realizada pela equipe assistencial da unidade hospitalar de origem, sob a indicação e responsabilidade do médico assistente de cada caso. Todos os casos foram submetidos aos critérios de elegibilidade, antes de serem alocados para as coortes específicas.

Foram estabelecidos os seguintes critérios para a inclusão dos pacientes no estudo: casos clínicos com suspeita neuroinfecciosa ou infecciosa de etiologia não definida após investigação diagnóstica convencional (sorologias, culturas, PCR direcionado, exames de imagem); casos clínicos neuropsiquiátricos com potencial de elucidação diagnóstica por estudo do exoma; encaminhamento por uma das unidades hospitalares parceiras; disponibilidade de amostra biológica adequada para análise laboratorial.

Já os critérios para exclusão dos pacientes no estudo foram: casos com etiologia previamente confirmada por outros métodos convencionais; amostras biologicamente comprometidas ou tecnicamente inadequadas para o sequenciamento; falta de documentação clínica suficiente para permitir a análise correlativa com os achados moleculares.

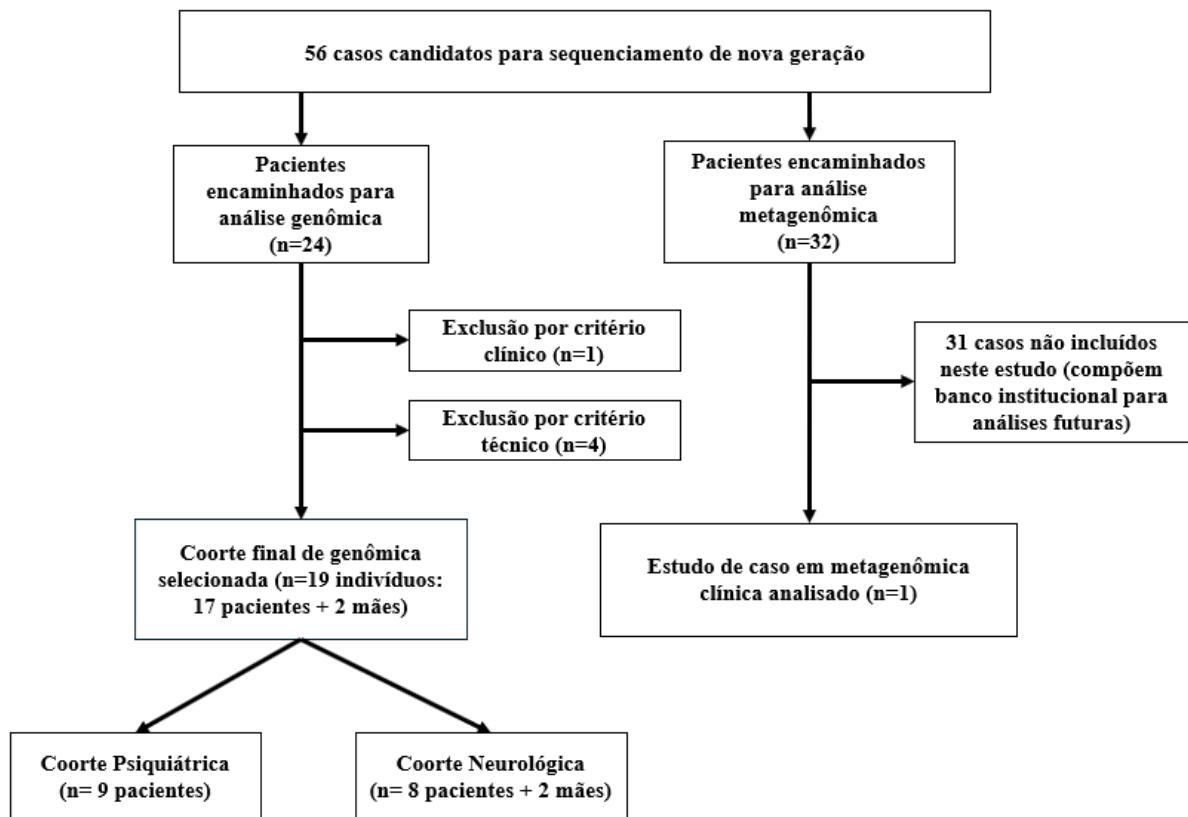
Para a frente de genômica, no período estipulado, foram encaminhados para análise na Fiocruz Ceará um total de 24 pacientes. A coorte final selecionada para este estudo foi composta por 19 indivíduos (17 pacientes e duas mães), após a aplicação dos critérios de exclusão: 1 paciente foi excluído por critério clínico (diagnóstico não neurológico) e 4 por critério técnico (amostra inadequada). A análise do exoma materno foi realizada em dois casos para contribuir na possível identificação do padrão de herança e identificar possíveis variantes *de novo*. A análise da coorte foi subdividida em dois grupos principais: coorte psiquiátrica (pacientes 1 a 9) e coorte neurológica (pacientes 10 a 19).

Para a frente de metagenômica, a abordagem utilizada foi a de estudo de caso. Foram analisadas 109 amostras de 32 pacientes. Deste universo, a presente dissertação selecionou, por conveniência, um caso emblemático de neuroinfecção para servir como prova de conceito. O caso, triado e encaminhado pela equipe de neurologia do HUWC, cumpria todos os critérios de inclusão, permanecendo sem diagnóstico etiológico após a realização de painéis de PCR *Multiplex*.

Os demais casos não incluídos compõem um banco de dados que será objeto de análises futuras. As amostras dele são constituídas por: pele; LCR; botão corneano; tecido adoposo; tecido pulmonar; sangue e soro; entre outros. As principais suspeitas clínicas deles foram: sepse; infecção multirresistente; infecção respiratória; bacteremia; infecção fúngica; osteomielite; meningite; neurotuberculose; além de casos indefinidos.

A Figura 5 ilustra o processo de seleção dos casos analisados neste estudo, considerando os critérios de inclusão e exclusão.

Figura 5. Fluxo de seleção das coortes genômica (psiquiátrica e neurológica) e metagenômica clínica para o sequenciamento de nova geração.



Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

5.4 Fluxos de trabalho da análise por Sequenciamento de Nova Geração

Todas as amostras biológicas foram recebidas e processadas em laboratório com Nível de Biossegurança 2 (NB-2), seguindo os protocolos institucionais de biossegurança da Fiocruz Ceará. Os fluxos de trabalho para as análises genômica e metagenômica seguiram etapas distintas.

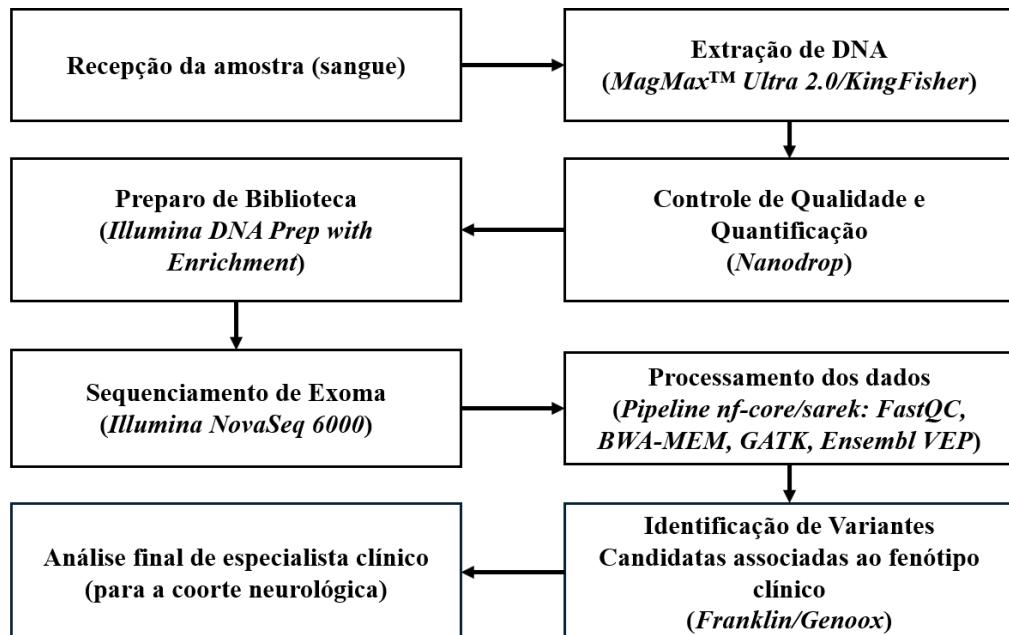
5.4.1 Fluxos da análise de exoma

A análise genômica seguiu um fluxo de trabalho dedicado, desde o processamento da amostra até a análise de bioinformática. A extração de DNA a partir de amostras de sangue total foi realizada de forma automatizada, utilizando o kit *MagMax™ DNA Multi-Sample Ultra 2.0* na plataforma *KingFisher*. A quantificação e o controle de pureza do material foram realizados por espectrofotometria (*Nanodrop*).

As amostras de DNA que atenderam aos critérios de qualidade foram submetidas ao preparo de bibliotecas para WES, utilizando o protocolo comercial *Illumina DNA Prep with Enrichment*. As bibliotecas finalizadas foram quantificadas, normalizadas e agrupadas (*pooled*) para o sequenciamento na plataforma de nova geração *Illumina NovaSeq 6000*.

O processamento dos dados de exoma utilizou o *pipeline nf-core/sarek*, que incluiu o controle de qualidade das leituras brutas (*FastQC*), alinhamento ao genoma humano de referência (*BWA-mem*), processamento e refinamento dos alinhamentos (*GATK MarkDuplicates, ApplyBQSR*), chamada de variantes (*GATK HaplotypeCaller*) e anotação funcional (*Ensembl VEP*). A etapa final de filtragem, classificação e correlação clínico-fenotípica foi conduzida na plataforma de interpretação genômica *Franklin* (da empresa *Genoox*) para a identificação de variantes candidatas. A coorte neurológico passou por análise final por especialista Neurologista, que também era o médico assistente dos pacientes. A Figura 6 ilustra todo o fluxo processual da análise genômica.

Figura 6. Fluxo de trabalho da análise genômica por sequenciamento de exoma completo.



Fonte: elaboração própria, 2025.

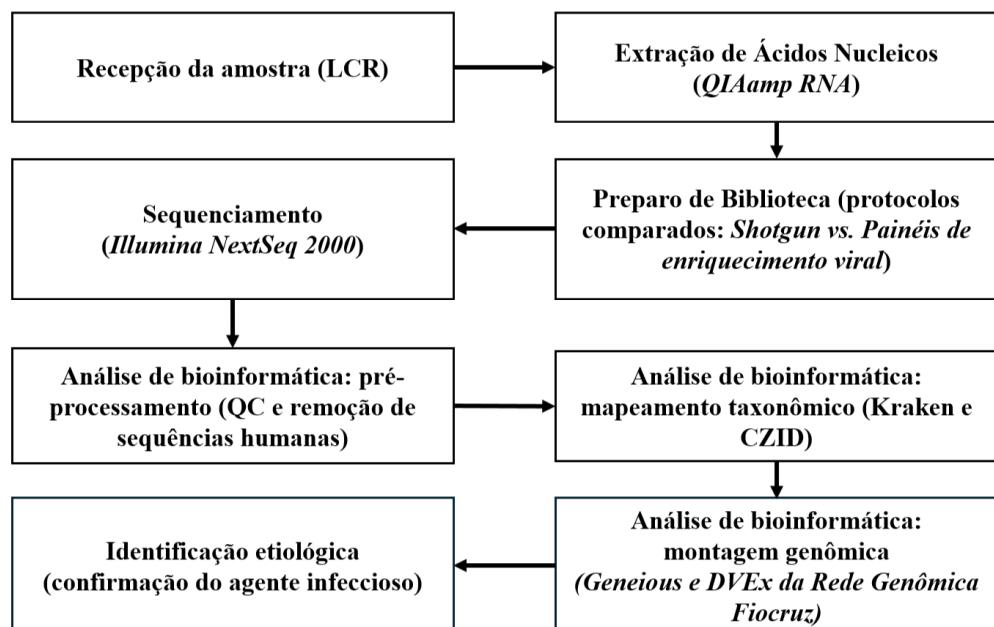
5.4.2 Fluxo da análise metagenômica

A análise metagenômica do estudo de caso de neuroinfecção também seguiu um fluxo de trabalho específico. A extração de ácidos nucleicos (RNA e DNA) a partir da amostra de LCR foi realizada com kits comerciais validados (método de processamento foi o *Qiaamp RNA*).

Foram testados e comparados quatro protocolos alternativos de preparo de biblioteca, incluindo sequenciamento por *shotgun* e por captura com painéis de enriquecimento viral (VSP), confirmando-se o melhor desempenho para o protocolo de captura.

As bibliotecas preparadas foram sequenciadas na plataforma *Illumina NextSeq 2000*. Os dados brutos gerados foram submetidos a um *pipeline* de bioinformática que se iniciou com o controle de qualidade e a subtração computacional de sequências de origem humana. A identificação taxonômica foi realizada com as plataformas em nuvem *Kraken* e *Chan Zuckerberg ID* (CZID) para o mapeamento inicial e alinhamento genômico. Subsequentemente, para a montagem de novo dos genomas virais e para um aprofundamento da análise, foram customizados *workflows* com as ferramentas *Geneious* e *Deep Virome Explorer* (DVEx), da Rede Genômica Fiocruz. Os resultados obtidos também foram avaliados por curadoria especializada. A Figura 7 ilustra todo o fluxo processual da análise metagenômica.

Figura 7. Fluxo de trabalho da análise metagenômica clínica por sequenciamento de nova geração.



Fonte: elaboração própria, 2025.

5.5 Construção do protocolo técnico-operacional

Com base na experiência acumulada na recepção, processamento e análise dos casos clínicos, foi elaborado um protocolo técnico-operacional colaborativo entre os hospitais da rede pública e a Fiocruz Ceará, contendo: diretrizes para solicitação de apoio diagnóstico molecular;

critérios de priorização dos casos e tipos de amostras aceitas; fluxo logístico de envio, análise e devolutiva; prazos, responsabilidades e critérios éticos; modelos de formulário clínico e de laudo molecular.

Para confecção do protocolo, foi realizado levantamento técnico e articulação interinstitucional para definição do fluxo operacional a partir da realização do *Workshop on Applied Metagenomics for the Clinical Setting*, ocorrido em 11 de agosto de 2025 na Fiocruz Ceará, em colaboração com a *Japan International Cooperation Agency* (JICA) e o Laboratório Analítico de Competências Moleculares e Epidemiológicas (ACME Lab). O evento reuniu especialistas internacionais do Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão e do *National Institute of Infectious Diseases* (NIID), além de representantes do HUWC, HGF, equipe da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HUWC e Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN).

Essas discussões forneceram subsídios metodológicos para a elaboração do protocolo proposto neste estudo. No âmbito do *workshop*, foi conduzida também com equipe laboratorial uma Estimativa Participativa (EP), que permitiu aos participantes detalharem as experiências vivenciadas no fluxo operacional e identificar os pontos críticos do processo (conforme modelo apresentado no Apêndice B). Os participantes foram aqueles relacionados às etapas: pré-analítica; analítica; e análises bioinformáticas.

Foram discutidos aspectos técnicos e estratégicos da mNGS, incluindo: fluxos laboratoriais e bioinformáticos; protocolos de coleta, controle de qualidade, armazenamento e transporte de amostras; diretrizes japonesas (GUIDE) e possibilidades de adaptação ao contexto brasileiro; critérios de indicação de mNGS em casos clínicos e de vigilância epidemiológica; integração entre clínica/hospital, laboratório e bioinformática para interpretação dos resultados; critérios de elegibilidade de casos para análise metagenômica; fluxos de comunicação entre unidades clínicas, laboratório de referência e equipe de bioinformática; procedimentos pré-analíticos para maximizar a integridade e qualidade das amostras; e a articulação com instâncias de vigilância e autoridades sanitárias.

5.6 Aspectos éticos

Este estudo foi conduzido em conformidade com os princípios éticos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e está respaldado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HGF, sob registro CAAE: 59264916.6.1001.5040.

Cabe destacar também que estudos epidemiológicos (como os de avaliação metagenômica clínica para quadros infecciosos no SUS) são ações de vigilância em saúde, prevista na Lei 8080/1990, com atenção às prerrogativas da Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais 13.709/2018 (confidencialidade e sigilo dos dados coletados).

6 RESULTADOS

6.1 Análise de exoma: correlações clínicas-genéticas

A análise genômica foi conduzida em uma coorte de 17 casos clínicos que preencheram os critérios de inclusão, representando a totalidade dos pacientes investigados para estudo, sem supressão de casos por resultados negativos. Em todos os casos avaliados a investigação por sequenciamento de exoma identificou variantes candidatas classificadas como Patogênicas (P), Provavelmente Patogênicas (PP) ou de Significado Incerto (VUS) com potencial correlação fenotípica para contribuição de elucidação etiológica ou direcionamento da investigação clínica. Do total analisado, a plataforma *Franklin* identificou 133 variantes candidatas, sendo predominante as variantes VUS (59,4%). A Tabela 4 sumariza a classificação das variantes candidatas.

Tabela 4. Distribuição percentual das variantes candidatas segundo a classificação da *Franklin/Genoxx* de todos os indivíduos submetidos a sequenciamento de exoma.

Categoría da Variante	Número (N)	Percentual (%)
Patogênica	13	9,8%
Provavelmente Patogênica	41	30,8%
Variante de Significado Incerto	79	59,4%
Total	133	100%

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Para contextualizar os achados genômicos, a Tabela 5 apresenta a caracterização da coorte dos pacientes, reunindo, para cada indivíduo, dados sociodemográficos (sexo e idade), informações técnicas das amostras (concentração e volume de DNA) e um resumo dos principais fenótipos clínicos descritos segundo a Ontologia do Fenótipo Humano (*HPOTerms*). Essa sistematização permite uma visão organizada da população analisada antes da exposição dos resultados obtidos na plataforma *Franklin*.

A análise da coorte foi subdividida em dois grupos principais: coorte psiquiátrica (elencados como pacientes 1 a 9) e coorte neurológica (elencados como pacientes 10 a 19). Para os casos psiquiátricos, os achados foram descritos a partir das variantes identificadas pela plataforma *Franklin/Genoxx*, sem curadoria clínica especializada até o momento. Nesses pacientes, foram observadas variantes candidatas em genes relacionados a transtornos do neurodesenvolvimento (*TCF4*, *SP9*) e achados incertos (*WWPI*), bem como variantes isoladas

em genes recessivos (*NPC1*, *ARSA*, *SMPD1*) que, em heterozigose, não permitem estabelecer causalidade definitiva, mas podem representar fatores de risco ou pontos de investigação futura.

Já na coorte neurológica, além da análise pela plataforma, foi realizada a curadoria clínica detalhada por especialista em Neurologia, médico assistente dos pacientes, o que possibilitou interpretações mais robustas. Três pacientes se destacaram como os achados mais relevantes: o Paciente 11, com variantes em *SPG7* e *AFG3L2*, plausíveis para explicar o fenótipo de ataxia; o Paciente 12, com mutação *nonsense* em homozigose no *NIT1*, altamente compatível com Doença dos Pequenos Vasos Cerebrais tipo 4, interpretado como diagnóstico molecular mais provável do estudo; e o Paciente 18, com variante em *ANXA11*, sugerindo achado plausível para explicar componente neuromuscular e leucoencefalopático. Esses achados foram considerados de alta relevância diagnóstica pelo especialista clínico.

Além dos achados principais, foram identificados achados secundários clinicamente relevantes em 11 dos 17 pacientes (64,7%), incluindo variantes em genes associados a risco trombótico (*F2*, *SERPINC1*, *PROS1*), predisposição a doenças metabólicas (*CFTR*, *PAH*) e fatores imunogenéticos de risco (*HLA-DRB1*). Tais variantes, embora não expliquem diretamente os fenótipos neurológicos ou psiquiátricos, podem ter implicações para aconselhamento genético, manejo clínico e prevenção secundária.

Em sequência, a Tabela 6 consolida os principais achados genômicos, correlacionando as variantes candidatas identificadas com os fenótipos observados. As listas completas de variantes candidatas e achados secundários encontram-se sistematizadas no Apêndice C.

Tabela 5. Características sociodemográficas e clínicas dos pacientes incluídos no estudo genômico do sequenciamento de exoma.

Paciente	Sexo	Idade	Concentração de DNA	Volume (uL)	Y-HAPLO (YLEAF)	HPO Principal	Detalhes clínicos
1	Masc	33	50,2	20	-	Psicose (HP:0000709)	-
2	Fem	32	194,8	20	-	Psicose (HP:0000709)	-
3	Masc	66	118,7	20	-	Psicose (HP:0000709)	-
4	Masc	31	61,9	20	-	Psicose (HP:0000709)	-
5	Fem	24	88,5	20	-	Psicose (HP:0000709)	Psicose; Refratário; Alucinação visual; Distonia
6	Masc	40	103,3	20	J-L26	Psicose (HP:0000709)	Comprometimento cognitivo; Psicose; Refratário; Telangiectasia; Anormalidade do sono
7	Masc	30	102,1	20	-	Psicose (HP:0000709)	Ataxia; Comprometimento cognitivo; Nistagmo vertical; Psicose; Diarreia crônica; Tremor; Polineuropatia; Refratário; Alucinação visual
8	Masc	31	119,8	20	Q-M848	Psicose (HP:0000709)	Psicose; Refratário; Comprometimento cognitivo; Esquizofrenia
9	Masc	43	103,6	20	G-Z7025	Psicose (HP:0000709)	Psicose; Refratário; Alucinação visual; Distonia
10	Fem	41	210,6	20	-	Demência frontotemporal (HP:0002145)	Demência frontotemporal; Início tardio em adultos jovens

11	Masc	55	190,9	20	Q-L54	Ataxia (HP:0001251)	Ataxia; Início tardio em adultos jovens; Autossômico recessivo
12	Masc	50	187,8	20	T-CTS3767	Leucodistrofia (HP:0002415)	Leucodistrofia; Sinal piramidal anormal; Hipercinesia
13	Fem	54	82,4	20	-	Miopatia (HP:0003198)	Miopatia; Fraqueza muscular proximal; Concentração elevada de creatina quinase circulante
14	Fem	76	97,8	20	-	Saudavel (HP:0032322)	Mãe do Paciente 14
15	Fem	74	121,4	20	-	Mioclonias (HP:0001336)	Ataxia; Comprometimento cognitivo; Esferoides axonais; Coreia; Leucoencefalopatia; Mioclonia
16	Fem	45	150,8	20	-	Leucoencefalopatia (HP:0002352)	Leucoencefalopatia; Infartos subcorticais; recorrentes
17	Fem	47	124,8	20	-	Saudável (HP:0032322)	Mãe do paciente 22
18	Masc	30	227,9	20	-	Ataxia (HP:0001251)	Tetraparesia; Ataxia; Deficiência intelectual leve; Leucodistrofia; Espasticidade
19	Fem	1	46,4	20	-	Anormalidades esqueléticas (HP:0001561)	Fístula anal; Cardiomiotipatia; Hipotonía; Polidrâmnio; Marca de pele pré-auricular; Atraso no desenvolvimento global

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Tabela 6. Achados genômicos relevantes do sequenciamento de exoma das coortes psiquiátrica e neurológica investigadas.

Paciente	Fenótipo Principal	Gene	Variante	Zigosidade	Classificação	Compatibilidade com padrão de herança	Observações
1	Psicose	WWP1	c.2234A>G	Heterozigoto	P	Sem padrão definido	Variante com preditores benignos, ocasionalmente relatada em autismo/traso cognitivo. Sem correlação robusta com o fenótipo clínico, interpretada como achado sem relevância diagnóstica
2	Psicose	TCF4	c.1822C>T	Heterozigoto	PP	AD: compatível	Sugere diagnóstico molecular de Síndrome de Pitt-Hopkins, sendo variante candidata plausível para explicar o fenótipo psiquiátrico
3	Psicose	Sem relação	-	-	-	-	-
4	Psicose, Distonia	SP9	c.1190G>C	Heterozigoto	PP	AD: compatível	Variante candidata plausível associada a transtorno do neurodesenvolvimento; literatura descreve distúrbios de movimento (distonia) e manifestações psiquiátricas
5	Psicose, Distonia	NPC1	c.1280C>G	Heterozigoto	VUS	AR: não compatível (necessária bialelia)	A variante isolada não explica sozinha o fenótipo, embora a correlação clínica seja sugestiva
6	Psicose, Comp. Cognitivo	NARS EXT2	c.1067A>C c.998A>G	Heterozigoto Heterozigoto	PP PP	NARS: compatível apenas se AD; não compatível se AR (exigiria bialelia)	NARS: candidata plausível pela sobreposição com transtorno do neurodesenvolvimento

						EXT2: compatível apenas se AD; não compatível se AR (exigiria bialelia)	EXT2: associado a exostoses múltiplas e síndromes de neurodesenvolvimento
7	Psicose, Ataxia	ARSA	c.465+1G>A	Heterozigoto	P	Não compatível isoladamente (exigiria bialelia para AR)	Variante candidata plausível associada à Leucodistrofia Metacromática; heterozigose pode indicar portador ou segunda mutação não detectada
8	Esquizofrenia	SMPD1	c.605G>A	Heterozigoto	PP	Não compatível isoladamente (doença AR exige bialelia)	Variante candidata plausível associado à Doença de Niemann-Pick A/B; heterozigose pode atuar como fator de risco para fenótipo psiquiátrico
9	Psicose, Distorção	Sem relação	-	-	-	-	-
10	Demência Frontotemporal	Sem relação	-	-	-	-	-
11	Ataxia	<i>SPG7</i>	c.376G>C	Heterozigoto	PP	SPG7: AR não compatível isoladamente; AD: compatível	SPG7: variante candidata plausível associada à Paraplegia Espástica Hereditária tipo 7. Pode explicar o fenótipo de ataxia em modelo AD, mas em AR seria necessário segundo alelo.
		AFG3L2 ¹	c.1985T>G	Heterozigoto	VUS	AFG3L2: compatível com herança AD; não compatível isoladamente com AR	AFG3L2: variante considerada relevante pelo especialista clínico; forte plausibilidade fenotípica para ataxia
12	Leucodistrofia	HLA-DRB1	c.100+1G>A	Heterozigoto	PP	HLA-DRB1: multifatorial: não causal isoladamente	HLA-DRB1: variante associada à susceptibilidade para doenças neuroinflamatórias (ex.: esclerose

		NIT1 ¹	c.883C>T	Homozigoto	PP		múltipla). Sem explicação direta para a leucodistrofia, mas relevante clinicamente como achado secundário
						NIT1: compatível com padrão AR (bialélico)	NIT1: associado à Doença dos Pequenos Vasos Cerebrais tipo 4; mutação nonsense em homozigose confere alta plausibilidade como diagnóstico molecular do caso
13	Miopatia, Epilepsia	BCO1	c.736A>G	Heterozigoto	VUS	AD: compatível (mas sem evidência clínica estabelecida)	Variante associada a hiper-carotenemia e hipovitaminose A. Não há correlação estabelecida com miopatia/epilepsia
15	Mioclonia	SAMD9	c.2053C>T	Heterozigoto	PP	AD: compatível	Variante candidata plausível <i>nonsense</i> associada à síndrome MIRAGE e a quadros neurodegenerativos. Em heterozigose, pode explicar o fenótipo de mioclonia. Recomenda-se acompanhamento hematológico devido à associação com predisposição a mielodisplasia/monossomia 7
16	Leucoencefalopatia	SERPINC1 NIT1	c.1246G>T	Heterozigoto	P	AD: compatível (heterozigose suficiente para predispor)	Variante candidata plausível associada a deficiência de antitrombina III. Achado compatível com predisposição a eventos tromboembólicos recorrentes, podendo explicar a leucoencefalopatia vascular
18	Ataxia	ANXA11 ¹ PAH	c.282dup c.1066-11G>A	Heterozigoto	PP VUS	ANXA11: AD compatível (heterozigose)	ANXA11: variante <i>frameshift</i> associada a miopatia de corpúsculos de inclusão/ALS-23. Achado

		PROS1	c.550G>A	Heterozigoto	PP	suficiente para causar doença)	plausível para explicar componente neuromuscular/leucoencefalopático
						PAH: AR não compatível em heterozigose isolada	PAH: em heterozigose, indica apenas portador, sem explicação para o fenótipo do paciente. Achado incidental, relevante apenas para aconselhamento genético.
						PROS1: AD potencialmente compatível (mas evidência incerta)	PROS1: proteína S. Pode indicar predisposição para trombofilia em modelo AD, mas a evidência funcional ainda é incerta. Não explica o fenótipo neurológico
19	Cardiompatia, Hipotonia, Atraso no Desenvolvimento	WFS1	c.1672C >T	Heterozigoto	P	WFS1: AR (Wolfram) não compatível em heterozigose; AD (perda auditiva não- sindrômica/Wolfram- like): possível, mas fenótipo principal não é auditivo	WFS1: para doença recessiva (Wolfram), sugere portador, sem explicação isolada do fenótipo. Em formas dominantes, WFS1 associa- se a perda auditiva neurosensorial e fenótipos “Wolfram-like”. No caso atual, a correlação clínica é baixa
		CFTR	c.1521_1523del		P	CFTR: AR (Fibrose Cística): não compatível em heterozigose isolada; AD: possíveis fenótipos leves (bronquiectasias), sem correspondência com quadro atual	CFTR: associada classicamente a Fibrose Cística (AR). Sugere ser portador, sem explicação isolada do fenótipo. Pode ter relevância clínica em formas brandas (bronquiectasias/ Aplasia Congênita Bilateral dos Vasos Deferentes).
		F2	c.*97G>A		P		

	F2: AR: não compatível em heterozigose isolada; AD: compatível (risco trombótico aumentado)	F2: variante clássica de risco trombótico em <i>F2</i> (Protrombina). Em heterozigose, confere predisposição a trombose venosa e arterial. Achado secundário que sugere impacto clínico para manejo preventivo (anticoagulação, rastreio familiar).
--	---	---

Legenda: P – Patogênica; PP - Provavelmente Patogênica; VUS - Variante de Significado Incerto; AR – Autossômica recessiva; AD – Autossômica dominante; ¹Variantes destacadas pelo especialista clínico em Neurologia como mais relevantes para explicação do fenótipo.

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

6.2 Análise em metagenômica clínica

6.2.1 Estudo de caso: *Leucoencefalopatia multifocal progressiva por vírus John Cunningham*

A utilidade clínica da metagenômica foi avaliada em um estudo de caso de neuroinfecção de etiologia indefinida por métodos convencionais. Trata-se de um paciente masculino de 25 anos, admitido no HUWC–UFC com quadro neurológico agudo (suspeita de Acidente Vascular Cerebral) e diagnóstico recente de infecção por HIV. A investigação inicial para agentes etiológicos no LCR por métodos microbiológicos e moleculares convencionais foi negativa e o paciente não apresentou resposta ao tratamento empírico para neurotoxoplasmose. Também houve hipótese etiológica de infecção por *John Cunningham* (JCV), mas não havia método convencional disponível na unidade hospitalar para confirmação.

Diante do quadro inconclusivo, uma amostra de LCR foi submetida à análise mNGS. A análise identificou objetivamente o vírus JCV com alta confiança e cobertura genômica superior a 95%. Após curadoria especializada, esse achado molecular permitiu a confirmação do diagnóstico de Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LEMP) e o consequente direcionamento da conduta clínica.

6.2.2 Desafios operacionais

Para subsidiar a construção de um fluxo de trabalho viável no Ceará, foi realizado o *Workshop on Applied Metagenomics for the Clinical Setting* (Fiocruz Ceará, 11 de agosto de 2025) que constituiu um marco relevante para a consolidação de parcerias e para o debate sobre estratégias de incorporação dessa tecnologia à realidade do Ceará. O evento foi organizado em colaboração com representantes especialistas de instituições nacionais e internacionais.

Durante o encontro, foram apresentados fundamentos técnicos da mNGS, desde as diferenças entre as gerações de sequenciamento (*Sanger*, 2^a e 3^a gerações), até a organização do fluxo *WET* (laboratório) e *DRY* (bioinformática), passando por protocolos de coleta, preparo de biblioteca, controle de qualidade, mitigação de contaminação e interpretação de resultados. As diretrizes japonesas (GUIDE) para utilização padronizada da mNGS em doenças infecciosas emergentes ou de etiologia desconhecida serviram como referência metodológica, mas foi ressaltada a necessidade de adaptar tais estratégias à epidemiologia e à infraestrutura brasileiras.

A etapa de diálogo entre os participantes foi especialmente relevante para discutir estratégias de viabilização da metagenômica no Ceará. Foram identificados três eixos de

aplicação prioritária: assistencial, com foco em casos clínicos complexos não elucidados por métodos convencionais; vigilância epidemiológica, visando a detecção de patógenos emergentes e eventos de relevância para a saúde pública; e pesquisa, integrando estudos de base populacional e molecular.

O debate também enfatizou a importância da etapa pré-analítica, incluindo definição do tipo e volume de amostra, implementação de controles internos e negativos, garantia de integridade e rastreabilidade do material biológico, além de padronização de fluxos de armazenamento e transporte. Foi discutida a viabilidade de um fluxo oficial articulado pelo Ministério da Saúde, com a Fiocruz Ceará como um dos polos de referência, de forma a reduzir a atual dependência de outras unidades da rede (como as Fiocruz Pernambuco e Rio de Janeiro) para análises metagenômicas.

Outro ponto de consenso foi a necessidade de integração entre clínicos/hospitais, laboratórios e equipes de bioinformática (modelo colaborativo descrito como *Clinical – Wet – Dry*) garantindo que os resultados obtidos sejam clinicamente relevantes, tecnicamente robustos e epidemiologicamente úteis. Por fim, os representantes japoneses reforçaram que não é possível replicar integralmente o modelo adotado no Japão devido às diferenças no perfil epidemiológico e no sistema de saúde brasileiro, mas se colocaram à disposição para suporte técnico e cooperação científica.

Durante o evento, também foi realizada uma EP, que oportunizou aos participantes o detalhamento das experiências vivenciadas no fluxo operacional da equipe da Fiocruz Ceará. Os pontos críticos levantados na EP se concentraram nas seguintes áreas:

1. Obstáculos no fluxo laboratorial (*Wet*): a equipe relatou, de forma consistente, que as etapas de análise bioinformática e interpretação e a extração de material genético são as mais demoradas do processo. A extração, em particular, foi apontada como a de maior risco de falha. Na visão dos especialistas do *workshop*, essa constatação reforça a necessidade de kits e protocolos validados, capazes de mitigar a contaminação e a alta proporção de DNA do hospedeiro, um problema comum em amostras clínicas. A complexidade do fluxo de trabalho e a falta de padronização foram tópicos centrais das discussões e a experiência japonesa foi usada como modelo de referência para o desenvolvimento de diretrizes técnicas locais.
2. Desafios de comunicação e colaboração: a EP evidenciou, de maneira consistente, que a ausência de um canal padronizado de devolutiva e a falta de integração entre as equipes clínica/hospital e laboratório são as principais dificuldades de comunicação. Este resultado validou a proposição de um modelo colaborativo (*Clinical – Wet – Dry*),

discutido no *workshop*, como solução para garantir que a informação flua de maneira eficiente. A crítica recorrente sobre a lacuna de informações clínicas relevantes nos formulários de solicitação também foi um ponto de consenso no *workshop*, o que levou à conclusão de que a etapa pré-analítica, com a padronização do formulário, é tão importante quanto o sequenciamento em si.

3. Necessidade de capacitação e recursos: os participantes do *workshop*, com base na percepção da equipe considerou o treinamento como muito importante, enfatizaram que a capacitação profissional é um pilar para a sustentabilidade da tecnologia no SUS. A necessidade de treinamento em ferramentas de bioinformática e o desenvolvimento de protocolos de análise foram identificados como prioridades. A cooperação técnica internacional, como a oferecida pelos representantes japoneses, foi vista como uma oportunidade de fortalecer o capital intelectual na região.

A EP também possibilitou, de modo mais objetivo, que os principais integrantes da equipe da Fiocruz Ceará envolvidos na aplicação da mNGS identificassem os principais obstáculos ao trabalho. Houve 100% de concordância (6/6 participantes) de que as etapas de Extração de Material Genético, Preparo de bibliotecas, Análise Bioinformática e Interpretação e Laudo são demoradas ou muito demoradas. A etapa de Extração de Material Genético foi especificamente identificada como o maior risco de falha técnica por 83% dos participantes (5/6).

A EP também quantificou os desafios de comunicação e as necessidades sistêmicas. A Lacuna de informações clínicas relevantes nos formulários de solicitação foi apontada como uma dificuldade por 100% dos participantes (6/6), sendo o principal desafio de comunicação identificado. A qualidade e adequação da amostra (fase pré-analítica) foi eleita o fator mais crítico para o sucesso do diagnóstico pela metade da equipe (50%, 3/6). Por fim, houve um consenso unânime (100%, 6/6) de que o treinamento da equipe é "Muito importante" para a implementação da tecnologia no SUS.

Esses achados orientaram diretamente a elaboração do protocolo técnico-operacional proposto neste estudo, fundamentando sua relevância prática e exequibilidade no SUS.

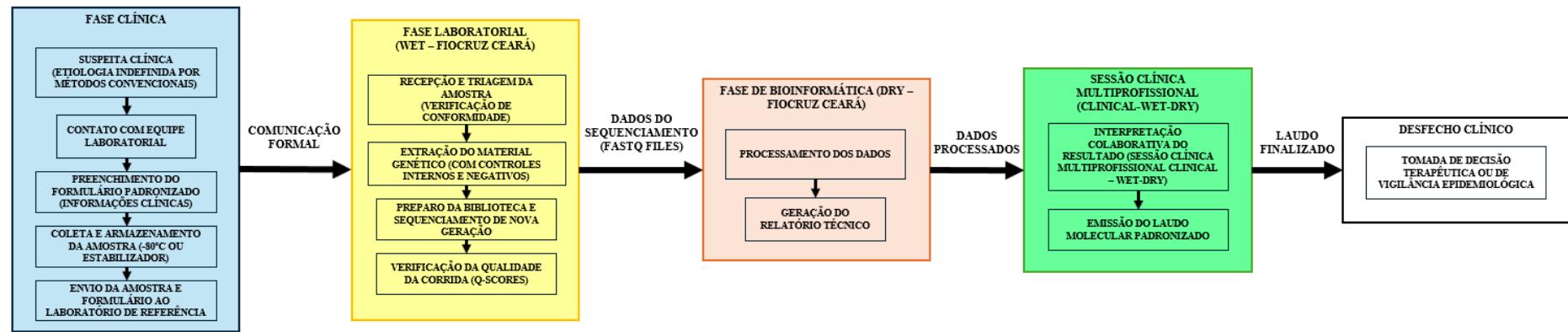
6.2.3 Protocolo técnico-operacional

A elaboração das bases do protocolo técnico-operacional foi concebida como uma resposta direta às lacunas e barreiras identificadas com este estudo e nas discussões técnicas com a equipe multidisciplinar e parceiros institucionais. O protocolo, estruturado a partir da

integração dos fluxos assistenciais, laboratoriais e de bioinformática, tem como objetivo principal formalizar um fluxo de diagnóstico molecular por mNGS para casos clínicos complexos de etiologia indefinida no contexto do SUS do Ceará. O modelo adotado baseia-se no conceito de cooperação interinstitucional, visando garantir que os resultados sejam clinicamente relevantes, tecnicamente robustos e epidemiologicamente úteis.

O fluxograma desenvolvido que integra as fases clínica, laboratorial (*wet-lab*) e de bioinformática (*dry-lab*), culminando em uma sessão multiprofissional para interpretação e devolução do laudo estruturado está representado na Figura 8.

Figura 8. Fluxograma do protocolo técnico-operacional para metagenômica clínica no Ceará.



Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

6.2.3.1 Fase clínica

Esta fase representa a interface do protocolo com a assistência em saúde e ocorre integralmente na unidade hospitalar, sob a responsabilidade do corpo clínico. Baseada nas dificuldades de comunicação e na lacuna de informações levantadas pela EP, essa etapa foi desenhada para assegurar a qualidade e a relevância da amostra desde a origem.

O processo se inicia com o clínico assistente do hospital, que identifica um paciente com suspeita de doença infecciosa de etiologia desconhecida, em que os métodos diagnósticos convencionais (como exames de imagem, cultura, PCR direcionado e sorologia) foram inconclusivos.

Para mitigar a "lacuna de informações clínicas relevantes" identificada na EP, é crucial o preenchimento de um formulário padronizado. Esse documento deve incluir dados demográficos, hipóteses diagnósticas, histórico detalhado de antibioticoterapia e os resultados dos exames convencionais já realizados. A completude e a precisão das informações clínicas são essenciais para a interpretação correta dos resultados de sequenciamento.

A amostra biológica (por exemplo, LCR, tecido, fluido brônquico) deve ser coletada seguindo rigorosas técnicas assépticas para evitar contaminação por microrganismos da microbiota típica ou do ambiente laboratorial, um dos principais riscos apontados pelos especialistas. A estabilização imediata da amostra, preferencialmente por congelamento a -80°C ou em um meio de preservação de ácidos nucleicos, é vital para manter a integridade do DNA e do RNA, especialmente em casos de suspeita de patógenos virais.

A comunicação entre o hospital e o laboratório de referência é formalizada por um canal padronizado, que assegura a rastreabilidade da amostra e mitiga a "ausência de um canal de devolutiva" observada na EP. O envio logístico deve garantir o transporte da amostra em condições que preservem a sua integridade.

6.2.3.2 Fase laboratorial (Wet-Lab)

Esta fase é conduzida na Fiocruz Ceará e engloba o processamento técnico-científico da amostra. O fluxo foi desenhado para contornar a complexidade e o risco de falha nas etapas de extração e preparo da biblioteca, identificados como um dos principais obstáculos pela equipe.

Ao receber a amostra, a equipe de laboratório realiza uma triagem minuciosa para verificar a conformidade com os critérios de volume, acondicionamento e documentação clínica. Apenas amostras que atendem aos padrões de qualidade são aceitas para processamento.

A extração do material genético é uma etapa crítica e um dos principais riscos operacionais. O protocolo propõe a utilização de um método robusto que maximize a liberação do DNA e do RNA de uma ampla variedade de microrganismos (incluindo bactérias com paredes celulares espessas, como micobactérias, e fungos). Controles negativos, que consistem em reagentes livres de amostra, e controles internos (*spike-ins*) com material genético de microrganismos não patogênicos são utilizados para monitorar a contaminação e a eficiência da extração, respectivamente.

O material extraído é preparado em uma biblioteca de sequenciamento para as plataformas de NGS. O mNGS é, por natureza, uma abordagem de sequenciamento não enviesada (*shotgun*), o que significa que o material genético de todos os organismos presentes na amostra (hospedeiro, patógenos e comensais) é sequenciado em massa. O preparo da biblioteca deve ser seguido de um rigoroso controle de qualidade para garantir a concentração adequada e o tamanho dos fragmentos, antes de ser submetido à corrida de sequenciamento em um equipamento de alta capacidade, como o *Illumina MiSeq*.

6.2.3.3 Fase de bioinformática e devolutiva (Dry-Lab e interface clínica)

Esta fase, identificada como a mais demorada, é o elo final do protocolo. Ela transforma os dados brutos de sequenciamento em informações diagnósticas úteis.

Os dados de sequenciamento são processados por meio de um *pipeline* bioinformático validado. A primeira etapa consiste na remoção das sequências do hospedeiro, que podem representar mais de 90% dos dados brutos, para focar nas leituras microbianas. Em seguida, as sequências filtradas são alinhadas a bancos de dados de referência (como o *GenBank* ou o *FDA-ARGOS*) para a identificação taxonômica dos microrganismos presentes.

A interpretação dos resultados de mNGS é complexa e exige um julgamento clínico e microbiológico para distinguir patógenos de contaminantes ou colonizadores. A EP reforçou a necessidade de uma equipe multidisciplinar para essa etapa. O protocolo propõe a realização de sessões clínicas multiprofissionais composto por especialistas do hospital, do laboratório e da bioinformática, a fim de validar a relevância clínica do achado e formular a melhor devolutiva.

O resultado da interpretação colaborativa é formalizado em um laudo padronizado e estruturado. Este documento deve ser claro, objetivo e conter todas as informações necessárias para auxiliar na tomada de decisão do clínico, incluindo a lista de patógenos identificados, suas abundâncias relativas e, quando aplicável, dados sobre resistência antimicrobiana. Este é o ponto final da "devolutiva" ao hospital, que agora ocorre de forma formal e padronizada.

7 DISCUSSÃO

7.1 Síntese dos principais achados

O presente estudo demonstrou o duplo impacto, diagnóstico e estratégico, da incorporação de tecnologias de NGS para doenças neurológicas no âmbito do SUS no Ceará. A análise genômica da coorte de 17 casos clínicos complexos revelou achados clinicamente relevantes, e, mais especificamente, permitiu estabelecer uma etiologia genética provável para o fenótipo principal em 37,5% (3/8) da subcoorte neurológica após a curadoria clínica especializada, um rendimento diagnóstico alinhado às referências da literatura internacional. Esse resultado evidencia o alto potencial da ferramenta para elucidar casos de difícil diagnóstico e reduzir a chamada “odisseia diagnóstica”. Enfatiza-se que as interpretações deste estudo devem também considerar as suas limitações (que são apresentadas e discutidas a seguir).

Adicionalmente, a aplicação da abordagem metagenômica permitiu a elucidação de um caso complexo de neuroinfecção previamente inconclusivo por métodos convencionais, reforçando sua utilidade como ferramenta de segunda linha em cenários de alta complexidade. A partir da evidência gerada por estes resultados clínicos e da identificação de barreiras operacionais por meio de pesquisa participativa, foi desenvolvida as bases do protocolo técnico-operacional para a integração estruturada dessas tecnologias à rede de saúde local, constituindo a contribuição pragmática desta dissertação.

7.2 Impacto da análise de exoma no diagnóstico

A implementação da genômica diagnóstica nesta pesquisa demonstrou um impacto clínico-diagnóstico substancial na elucidação de doenças neurológicas complexas na coorte de pacientes do Ceará. Embora a investigação por sequenciamento de exoma tenha identificado variantes candidatas com potencial relevância em todos os pacientes, o poder de elucidação etiológica foi mais precisamente mensurado na subcoorte neurológica ($n=8$), que passou por uma detalhada curadoria clínica por especialista. Nesse grupo, foi possível estabelecer um diagnóstico molecular de considerável probabilidade para o fenótipo principal em 3 dos 8 casos (37,5%).

Esse rendimento diagnóstico está alinhado aos resultados de grandes coortes internacionais, como a de Alvarez-Mora et al. (2023), que reportou uma taxa de 32% em pacientes com desordens neurológicas, e se insere na faixa de 25-60% frequentemente encontrada na literatura para grupos semelhantes (Srivastava et al., 2022; Watson et al., 2024).

Esse resultado pode ser atribuído a uma combinação de fatores: primeiramente, a seleção rigorosa de pacientes cujos quadros permaneciam refratários à extensa investigação convencional, enriquecendo a amostra com casos de provável etiologia monogênica; e em segundo lugar, a aplicação de uma análise fenotípica aprofundada em conjunto com plataformas de interpretação genômica, que maximizam a correlação clínico-genética.

7.2.1 Elucidação diagnóstica na coorte neurológica: casos com curadoria clínica

A aplicação do sequenciamento de exoma demonstrou seu mais alto poder de elucidação no caso do Paciente 12, um homem de 50 anos com um quadro clínico de leucodistrofia. Este caso serve como um exemplo paradigmático de como a genômica pode fornecer um diagnóstico molecular mais definitivo, encerrando uma longa jornada de incerteza e, crucialmente, conectando o paciente a uma entidade nosológica específica e recém-caracterizada na literatura. A análise revelou uma variante *nonsense* (c.883C>T) em homozigose no gene *NIT1*, classificada na plataforma *Franklin* como provavelmente patogênica.

Esse achado é diretamente corroborado pelo estudo de Rutten et al. (2024), que descreveu, pela primeira vez, uma doença de pequenos vasos cerebrais de herança autossômica recessiva causada por variantes bialélicas de perda de função no gene *NIT1*. A síndrome, denominada NIT1-SVD (*small vessel disease*), é caracterizada por uma tríade de distúrbios de movimento de início na meia-idade, espaços perivasculares massivamente dilatados na neuroimagem e hemorragia intracerebral (Rutten et al., 2024). A apresentação clínica do Paciente 12 é, portanto, altamente compatível com esta nova síndrome, permitindo refinar seu diagnóstico de uma "leucodistrofia" inespecífica para uma etiologia molecular precisa. A robustez deste diagnóstico é multifatorial: uma variante *nonsense*, como a encontrada, leva a uma proteína truncada e não funcional, e o estado de homozigose alinha-se perfeitamente ao padrão de herança recessivo descrito (Rutten et al., 2024).

Para além desta síndrome específica, o gene *NIT1* já vinha sendo implicado em patologias neurológicas, reforçando seu papel na homeostase do SNC. Um estudo de exoma em uma família com *Síndrome de SeSAME* — outra doença neurológica de herança recessiva — identificou uma variante rara em *NIT1* que segregava com a doença em todos os pacientes, sugerindo seu papel como um potencial gene modificador (Nadella et al., 2019).

Do ponto de vista mecanístico, a patologia vascular observada na NIT1-SVD pode ser explicada por, ao menos, duas vias moleculares. Primeiramente, estudos em biologia do câncer demonstraram que a proteína *NIT1* modula a via de sinalização *TGFβ-Smad* (Lin et al., 2018).

Essa via é crítica para a manutenção da integridade da parede dos vasos sanguíneos e a regulação da matriz extracelular. Portanto, a perda de função do NIT1 pode levar a uma desregulação da sinalização *TGFβ* nos pequenos vasos cerebrais, comprometendo sua estrutura e função. Em segundo lugar, a *NIT1* é conhecida por sua função como uma enzima de reparo metabólico, responsável pela hidrólise de subprodutos do metabolismo da glutationa (Rutten et al., 2024). A ausência dessa função de depuração pode levar ao acúmulo de metabólitos tóxicos, explicando os grandes depósitos elétron-densos encontrados na patologia dos vasos de pacientes com a síndrome.

Assim, o resultado do Paciente 12 não apenas soluciona um caso complexo, mas também valida, em nossa população, os achados de uma síndrome rara recém-descoberta. Mais importante, ele ilustra o valor insubstituível do exoma como uma ponte que conecta a prática clínica, a fronteira do conhecimento científico e a elucidação dos mecanismos moleculares da doença.

Ademais, o caso do Paciente 12 ressalta que o valor do sequenciamento de exoma transcende a elucidação da hipótese diagnóstica primária, fornecendo informações cruciais para a saúde global do paciente. Embora a investigação principal tenha sido concluída com o diagnóstico de NIT1-SVD, também houve resultado de possível impacto para a medicina preventiva do paciente a partir da identificação de um achado secundário: uma variante provavelmente patogênica no gene *MSH2*. Variantes deletérias neste gene são uma das principais causas da *Síndrome de Lynch*, uma condição de alto risco hereditário para múltiplos tipos de câncer, principalmente colorretal (Jia et al., 2021). Esse diagnóstico é de importância, pois pode acionar um protocolo de vigilância oncológica intensiva para o paciente e o rastreamento em cascata para seus familiares, com o potencial de prevenir a morbidade e mortalidade por câncer (Vasen et al., 2007). Este achado demonstra, portanto, a utilidade clínica do exoma como ferramenta de perfilamento genômico, para além da elucidação diagnóstica primária.

O Paciente 18 exemplifica um quadro complexo cujo fenótipo é mais bem explicado pela identificação de uma variante PP no gene *ANXA11* (c.282dup). A literatura recente tem expandido significativamente o espectro clínico associado a esse gene, originalmente descrito como relacionado à Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Hoje, sabe-se que *ANXA11* está implicado em um contínuo que abrange a ELA, a Demência Frontotemporal (DFT) e quadros neurodegenerativos atípicos, que podem ocorrer sem a manifestação clássica de ELA no início do curso clínico (Jiang et al., 2022; Wang et al., 2022).

Esse achado alinha-se de forma consistente com os componentes fenotípicos observados no Paciente 18, incluindo manifestações neurodegenerativas não usuais e reforça a importância da incorporação do NGS como ferramenta de investigação diagnóstica. Esse caso contribui para a compreensão crescente de que genes como *ANXA11* possuem espectros clínicos mais amplos do que inicialmente reconhecido, podendo explicar fenótipos complexos em pacientes sem diagnóstico conclusivo por métodos convencionais.

Finalmente, a análise do Paciente 11, um homem de 55 anos com ataxia, ilustra a fronteira da interpretação genômica e o papel crucial da curadoria especializada. Esse caso demonstra que, mesmo na ausência de um diagnóstico molecular que siga um padrão mendeliano clássico, o exoma pode fornecer achados de altíssima relevância que refinam potencialmente as hipóteses diagnósticas e direcionam o manejo clínico futuro.

A investigação identificou duas variantes heterozigotas em genes distintos: uma PP em *SPG7* e uma VUS em *AFG3L2*. A interpretação desse caso reside na função biológica das proteínas codificadas por esses dois genes. A literatura demonstra que a *AFG3L2* e a paraplegina (produto do gene *SPG7*) são parceiras moleculares que se unem para formar um complexo hetero-oligomérico funcional: a protease m-AAA, uma máquina molecular essencial na membrana interna da mitocôndria (Cagnoli et al., 2010; Tunc et al., 2019; Zühlke et al., 2015). Essa protease é vital para o controle de qualidade do proteoma mitocondrial e para a montagem das cadeias respiratórias, sendo sua função especialmente crítica para a sobrevivência dos neurônios, em particular as células de Purkinje no cerebelo.

Com essa conexão molecular estabelecida, a hipótese mais parcimoniosa é que o fenótipo do Paciente 11 resulta de um efeito de herança digênica, ou seja, o paciente teria sofrido um "duplo acometimento" na mesma via funcional. A variante heterozigótica em *SPG7* comprometeria parcialmente uma das subunidades da protease m-AAA, enquanto a variante em *AFG3L2* afetaria a outra. A combinação de dois componentes parcialmente defeituosos poderia prejudicar a eficiência geral do complexo proteico, ultrapassando o limiar de resiliência celular e levando à disfunção mitocondrial e neurodegeneração que se manifesta como ataxia. Essa hipótese é sustentada pelo fato de que a perda de função bialélica em qualquer um desses genes, isoladamente, já é conhecida por causar doenças neurológicas de herança recessiva.

Portanto, o resultado do exoma no Paciente 11 pode revelar um provável mecanismo de herança digênica em uma via molecular única, transformando um quadro de "ataxia indeterminada" em uma suspeita potencial de disfunção da protease m-AAA mitocondrial.

7.2.2 Potencial de elucidação na coorte psiquiátrica: hipóteses moleculares

A análise da coorte psiquiátrica, embora pendente de curadoria clínica final, já exemplifica o potencial impacto do sequenciamento de exoma na reclassificação de transtornos neuropsiquiátricos complexos como discutido a seguir.

O caso do Paciente 2, uma mulher de 32 anos com fenótipo principal de "Psicose", é paradigmático. A investigação genômica revelou uma variante *missense* heterozigota, classificada como de alta confiança e predita como deletéria, c.1822C>T (p.L608F), no gene *TCF4*.

Este gene é a causa etiológica da *Síndrome de Pitt-Hopkins* (PTHS), um grave transtorno do neurodesenvolvimento (NDD) de herança autossômica dominante. A apresentação clínica centrada em um quadro psicótico poderia, inicialmente, distanciar o caso do fenótipo clássico de PTHS. Contudo, a literatura demonstra que os acometimentos relacionados ao gene compreendem um espectro clínico amplo. Estudos mostram que pacientes com mutações em *TCF4* são frequentemente investigados para outras síndromes, como Angelman ou Rett, devido à sobreposição de características como atraso global do desenvolvimento e ausência de fala (Giurgea et al., 2008; Takano et al., 2010).

De fato, Takano et al. (2010) identificaram mutações em *TCF4* em 2% de uma coorte de pacientes com suspeita de Síndrome de Angelman, mas com testes genéticos negativos para esta. Adicionalmente, a ausência de sinais cardinais, como as anomalias respiratórias, não exclui o diagnóstico, reforçando a variabilidade fenotípica (Popp et al., 2022; Takano et al., 2010). Portanto, o fenótipo do Paciente 2 aparente se encaixar plausivelmente no espectro expandido dos transtornos relacionados ao *TCF4*.

A correlação genótipo-fenótipo reforça a gravidade do achado. A variante c.1822C>T está localizada no exón 18, que codifica parte do domínio funcional crítico bHLH (hélice-alça-hélice básico). Mutações que afetam este domínio estão consistentemente associadas aos fenótipos mais severos de PTHS, incluindo encefalopatias epilépticas graves (Kirikae et al., 2022). Em contraste, variantes localizadas fora desta região, como a descrita por Popp et al. (2022) no exón 15, tendem a resultar em fenótipos atípicos ou mais brandos. A localização da variante do Paciente 2 no domínio bHLH, portanto, confere possível plausibilidade à sua patogenicidade e é compatível com um quadro neurológico de grande considerável.

Além da correlação clínica, é possível propor um mecanismo molecular para a patogênese. Um estudo proteômico do cérebro em desenvolvimento identificou, de forma pioneira, a proteína *TCF4* como sendo enriquecida no nucléolo dos neurônios (Slomnicki et al., 2016). Os autores demonstraram que variantes de *TCF4* associadas à PTHS causam uma redução na biogênese ribossômica e na síntese proteica geral. Este achado sugere que a disfunção do *TCF4* prejudica uma função celular fundamental e altamente demandada durante o neurodesenvolvimento. Assim, a variante p.L608F do Paciente 2 pode não apenas comprometer a função da *TCF4* como fator de transcrição, mas também sua função nucleolar, resultando em uma perturbação da homeostase proteica que contribui para a severidade do fenótipo neuropsiquiátrico observado.

Em suma, é possível que o achado genômico no Paciente 2 transcendia um rótulo diagnóstico. Ele redefine a condição de uma "psicose" de etiologia incerta para um possível transtorno do neurodesenvolvimento de base molecular definida, com um mecanismo patogênico plausível e implicações diretas para o manejo clínico e o aconselhamento genético familiar, ilustrando de forma contundente o poder translacional da genômica na prática clínica.

Já o caso do Paciente 7, um homem de 30 anos com um fenótipo complexo que entrelaça sintomas psiquiátricos (psicose, alucinações) e neurológicos (ataxia, polineuropatia), exemplifica um dos maiores desafios diagnósticos na prática clínica. O sequenciamento de exoma, neste cenário, revelou um achado de potencial relevância: a presença de uma variante patogênica em heterozigose, c.465+1G>A, no gene *ARSA*. Este gene está associado à Leucodistrofia Metacromática (LM), uma doença de herança autossômica recessiva. O achado de uma única variante, portanto, levanta uma questão central: estaria o exoma apontando para um diagnóstico de LM ainda por se completar ou para um fator de risco genético em um quadro multifatorial?

A literatura científica é direciona quanto à natureza da variante c.465+1G>A: trata-se de uma mutação no sítio doador de *splicing* do ítron 2, consistentemente caracterizada como um "alelo nulo" ou "alelo zero", que impede a produção de qualquer enzima arilsulfatase A funcional (Gomez-Lira et al., 1998; Lugowska et al., 2005). É uma das mutações mais prevalentes em coortes de pacientes europeus, incluindo os de ancestralidade ibérica, e também em populações do Oriente Médio, sendo responsável por uma parcela significativa dos casos de LM (Duarte et al., 2017; Lugowska et al., 2005; Mahdieha et al., 2020). A homozigose para este alelo está invariavelmente associada à forma mais severa da doença, a LM tardo-infantil (Lugowska et al., 2005; Kubaski et al., 2022).

O fenótipo do Paciente 7, contudo, não corresponde à forma tardo-infantil, o que pode estar em acordo com o modelo genético da doença. A manifestação clínica da LM é ditada pela atividade enzimática residual. Indivíduos com as formas de início mais tardio (juvenil ou adulta) são tipicamente heterozigotos compostos, possuindo um alelo nulo (como o c.465+1G>A) e um segundo alelo que permite alguma atividade enzimática residual (Gomez-Lira et al., 1998; Dohertya et al., 2019). É crucial notar que estas formas tardias frequentemente se iniciam com um pródromo de manifestações psiquiátricas, incluindo psicose, mudanças comportamentais e declínio cognitivo, que podem preceder os sintomas motores por anos (Lugowska et al., 2005). A sobreposição entre a apresentação clínica do Paciente 7 e o quadro descrito para a LM de início tardio é uma possibilidade a ser considerada.

Diante do exposto, o achado genômico no Paciente 7 não deve ser interpretado como um resultado final, mas como o ponto de partida para duas hipóteses clínicas prioritárias. A primeira é que o paciente tenha um diagnóstico de LM por heterozigose composta, com uma segunda variante patogênica no gene *ARSA* ainda não detectada, possivelmente devido às limitações técnicas do exoma, como a dificuldade em identificar grandes deleções (Elgün et al., 2019). A segunda hipótese, mais especulativa, é que o estado de portador para essa condição neurodegenerativa grave possa atuar como um fator de risco significativo que contribui para seu fenótipo complexo.

Independentemente da hipótese, a identificação do alelo nulo no gene *ARSA* tem potencial clínico ao transformar um caso difuso de "psicose com comorbidades neurológicas" em uma possível investigação direcionada a uma doença de depósito lisossômico específica. Conforme ressaltado pela literatura, a suspeita clínica e molecular de LM comanda a realização de testes confirmatórios, como a quantificação de sulfatídeos na urina e a análise completa do gene *ARSA* (Dohertya et al., 2019). Assim, a análise de exoma funcionou como ferramenta que favorece a elucidação diagnóstica.

7.3 Metagenômica clínica como ferramenta diagnóstica estratégica

A elucidação de infecções do SNC representa um dos maiores desafios da prática clínica, com uma parcela significativa dos casos de encefalite permanecendo sem diagnóstico etiológico. Estudos de referência, como o de Wilson et al. (2019), demonstram a utilidade clínica do mNGS em coortes de pacientes com meningite e encefalite, estabelecendo a técnica como uma ferramenta diagnóstica poderosa. Neste contexto, o diagnóstico de LEMP por JCV,

realizado no âmbito deste estudo, ilustra de maneira concreta o potencial do mNGS, especialmente em populações vulneráveis.

O caso em questão era de um paciente imunossuprimido (pessoa convivendo com HIV), um grupo no qual o diagnóstico de patógenos oportunistas é crucial e frequentemente complexo. A literatura recente tem validado o mNGS como uma ferramenta superior aos testes convencionais nesta população específica (Zhu et al., 2025; Piantadosi et al., 2021). O sucesso na identificação do JCV no LCR do paciente, após insucesso dos métodos rotineiros, corrobora esses achados e ecoa outros relatos de caso que descrevem o diagnóstico de LEMP por mNGS em pacientes com HIV (Xia et al., 2019).

Esse resultado reforça a relevância de estabelecer um fluxo operacional estruturado, como o proposto neste estudo. O impacto do mNGS vai além da simples detecção; a tecnologia permite uma caracterização aprofundada do patógeno, como a análise de quasispecies virais do JCV, que tem implicações no entendimento da patogênese da doença (Takahashi et al., 2016). A capacidade de detectar e caracterizar genomicamente patógenos de forma rápida e não direcionada tem, portanto, implicações profundas não apenas para o desfecho clínico do paciente, mas também para a vigilância epidemiológica.

7.4 Da evidência à prática: desafios e soluções para implementação da metagenômica clínica no Ceará

A transição de uma tecnologia promissora como o NGS para a prática clínica é um processo complexo que demanda a construção de parcerias e consensos (Kammermeier et al., 2023). Nesse contexto, o *Workshop on Applied Metagenomics for the Clinical Setting*, realizado na Fiocruz Ceará, constituiu um marco fundamental neste estudo, servindo como espaço de diálogo e consensos sobre as estratégias de incorporação dessa tecnologia à realidade do Estado. O evento, que contou com a colaboração de especialistas nacionais e internacionais, permitiu não apenas a troca de conhecimentos técnicos, mas, crucialmente, a formação de um consenso sobre os pilares da implementação local.

Apesar dos avanços técnicos da genômica e metagenômica, sua implementação na prática clínica permanece um desafio. A literatura internacional tem mostrado que o impacto real dessas ferramentas não depende apenas da acurácia técnica, mas da forma como são incorporadas a fluxos assistenciais integrados e adaptadas às realidades locais (Kammermeier et al., 2023). Este estudo abordou diretamente este desafio, não apenas propondo um protocolo,

mas utilizando uma pesquisa operacional para embasar seu desenho em evidências concretas do cenário cearense.

A principal barreira para a implementação, tanto na literatura quanto nos achados deste estudo, é a integração entre as equipes. Gu, Miller e Chiu (2019) ressaltam que a eficiência do mNGS depende da articulação entre clínicos, microbiologistas e bioinformaticos. Esse ponto foi validado empiricamente pela EP, que revelou que os participantes apontaram a "lacuna de informações clínicas relevantes nos formulários" como um desafio crítico. O protocolo proposto mitiga esse problema, com uma "Fase Clínica" que padroniza a comunicação e exige o preenchimento de um formulário detalhado, garantindo que a pergunta clínica seja efetiva antes que a resposta molecular seja buscada.

A experiência internacional também sugere que a criação de protocolos institucionais padronizados é fundamental para garantir qualidade e reproduzibilidade (Su et al., 2024). Novamente, os dados da EP confirmam essa necessidade, ao quantificar a percepção de que as etapas de Extração e Preparo de Bibliotecas são entraves de tempo para da equipe, com a extração sendo o maior risco de falha técnica. A "Fase Laboratorial" do protocolo, com sua ênfase em métodos robustos, validação e uso de controles, é a resposta direta a essa demanda por padronização e redução de riscos.

Por fim, a literatura enfatiza que o valor da tecnologia não está apenas no dado laboratorial, mas na sua capacidade de orientar cuidados abrangentes, o que exige equipes coordenadas (Kammermeier et al., 2023). As bases do protocolo proposto nesta dissertação elevam este conceito a um processo formal através da "Sessão Clínica Multiprofissional". Essa etapa é a solução às barreiras da interpretação, identificada pelos participantes da EP, transformando a devolutiva de um ato técnico em um processo colaborativo. Portanto, a implementação clínica exige mais do que tecnologia: demanda infraestrutura, capacitação e, acima de tudo, protocolos que integrem as equipes. É nesse espaço que esse estudo se inseriu ao propor um fluxo técnico-operacional colaborativo capaz de traduzir a inovação científica em benefício direto para os pacientes no contexto do SUS.

A discussão e os encaminhamentos desse *workshop* forneceram suporte direto à proposta de um fluxo operacional para aplicação da metagenômica clínica em hospitais da região, em parceria com a Fiocruz Ceará, com foco inicial em casos clínicos de etiologia indefinida e potencial impacto na vigilância em saúde. As informações obtidas reforçam a pertinência da pesquisa, evidenciam sua aderência às necessidades regionais e nacionais e confirmam a importância de uma abordagem integrada entre assistência, vigilância e pesquisa para maximizar os benefícios da metagenômica clínica.

É igualmente importante considerar que os casos de metagenômica que permaneceram inconclusivos ou não foram consolidados como diagnósticos definitivos podem, eles próprios, ser uma evidência da necessidade de um fluxo estruturado. Uma falha na elucidação diagnóstica pode não residir na sensibilidade do sequenciamento, mas sim nas barreiras operacionais que este estudo identificou.

Uma amostra de baixa qualidade devido a problemas na coleta ou transporte (a fase pré-analítica, eleita como uma das mais crítica pela EP), ou a ausência de um histórico clínico detalhado (a lacuna de informação apontada por 100% da equipe), podem tornar impossível a tarefa de distinguir um patógeno real de um contaminante ou comensal. Portanto, a implementação do protocolo de mNGS institucionalizado não visa apenas contribuir às pesquisas científicas, mas também ao campo da assistência clínica e vigilância em saúde ao mitigar as falhas sistêmicas e fomentar que cada etapa processada possa retornar um resultado conclusivo e relevante.

7.5 Limitações do estudo

É imperativo reconhecer as limitações inerentes a este estudo para contextualizar adequadamente seus achados. A principal limitação reside no tamanho e na seleção da amostra. A coorte genômica, embora rica em detalhes, é composta por apenas 17 casos clínicos, o que impede a generalização do rendimento diagnóstico para populações mais amplas. Os resultados são provavelmente influenciados por um viés de seleção, uma vez que a coorte foi composta por casos complexos e refratários, com alta probabilidade pré-teste de uma etiologia monogênica.

De forma semelhante, na frente de metagenômica, embora múltiplos estudos tenham sido realizados pela equipe, apenas um caso de sucesso diagnóstico foi selecionado para ser apresentado em profundidade nesta dissertação, servindo como uma prova de conceito e estudo de caso e não como uma medida da acurácia geral da técnica no serviço. Também cabe destacar que a plataforma *Franklin/Genoox* não é um sistema concebido para diagnóstico autônomo, mas para uso em pesquisa e apoio ao diagnóstico, com interpretação humana especializada, tendo limitações como o alcance das variantes e a dependência de evidência pública e comunitária.

Em segundo lugar, as bases do protocolo técnico-operacional foram elaboradas com base numa pesquisa operacional e discussões com especialistas, mas sua eficácia e impacto real (como a redução do tempo para o diagnóstico ou a otimização de custos) não foram medidos

prospectivamente. A validação do protocolo em um estudo piloto de implementação permanece como uma etapa futura necessária.

Por fim, embora a EP tenha fornecido dados quali-quantitativos valiosos que nortearam o desenho do protocolo, as respostas revelaram dilemas e desafios sistêmicos mais profundos, como questões de cultura institucional e integração entre equipes, que não são resolvidos apenas por um fluxo de trabalho padronizado. Adicionalmente, deve-se considerar as limitações técnicas inerentes ao sequenciamento de exoma, que não detecta certas classes de variantes estruturais ou de repetição. Esses fatores, em conjunto, definem os contornos e o alcance das conclusões apresentadas, reforçando a necessidade de pesquisa contínua e implementação gradual para a consolidação dessas tecnologias no SUS.

7.6 Perspectivas futuras do Sequenciamento de Nova Geração e protocolos institucionais na saúde pública brasileira

A experiência internacional demonstra que a metagenômica diagnóstica tem impacto clínico direto. Wilson et al. (2019), em um dos maiores estudos multicêntricos conduzidos nos Estados Unidos, mostraram que a incorporação da mNGS em pacientes hospitalizados com suspeita de infecção não diagnosticada resultou em mudança de conduta clínica em uma parcela substancial dos casos (62% dos pacientes diagnosticados pela técnica), incluindo adequação ou suspensão de antimicrobianos e decisões sobre intervenções invasivas. Esse achado reforça a utilidade da técnica em cenários complexos, capazes de permanecer inconclusivos após extensa investigação convencional.

Entretanto, a transposição desses resultados para o contexto brasileiro enfrenta barreiras logísticas, financeiras e regulatórias. Salzberg et al. (2016) destacam a necessidade de curadoria bioinformática especializada, capaz de filtrar artefatos e integrar dados clínicos, o que implica não apenas investimento em equipamentos, mas também na formação de recursos humanos altamente capacitados. Esse desafio se alinha a iniciativas estratégicas nacionais, como o *Genomas Brasil*, instituído pela Portaria nº 1949/2020 (Brasil, 2020).

Outro aspecto crítico é a ausência de protocolos uniformes. Su et al. (2024) apontam que a falta de critérios claros para solicitação da mNGS é fonte de variabilidade e desperdício de recursos. Assim, a definição de fluxos padronizados (que englobem desde a coleta e transporte de amostras até *pipelines* bioinformáticos validados) é passo essencial para consolidar a técnica como ferramenta de rotina. Nesse sentido, o protocolo colaborativo Fiocruz-hospitais, proposto nesta dissertação, dialoga com a necessidade de

institucionalização, articulando hospitais sentinelas com laboratórios de referência em genômica.

Estudos recentes também sugerem que a metagenômica pode ser custo-efetiva quando utilizada de forma direcionada, em especial em casos complexos que demandariam múltiplos testes convencionais (Liu et al., 2019). Para o Brasil, onde a otimização de recursos é imperativa, tal perspectiva é particularmente relevante. Em paralelo, Kammermeier et al. (2023) destacam que o valor do sequenciamento genômico não está apenas no resultado laboratorial, mas em sua integração a fluxos clínicos coordenados, com devolutivas claras aos pacientes, aconselhamento genético e suporte psicossocial (condição essencial para reduzir a jornada diagnóstica e ampliar a equidade de acesso).

A dimensão ética e regulatória é igualmente central. A interpretação de VUS, os potenciais achados incidentais e a necessidade de consentimento informado robusto demandam marcos regulatórios sólidos e políticas claras de confidencialidade e devolutiva (Liu et al., 2019). Portanto, a implementação clínica exige não apenas tecnologia, mas também infraestrutura laboratorial, integração em rede, capacitação profissional, protocolos uniformes, avaliação econômica e regulação ética.

O avanço das tecnologias de sequenciamento genômico e metagenômico já transforma a prática diagnóstica em neurologia e infectologia. No Brasil, sua consolidação depende de políticas públicas capazes de tornar essas soluções acessíveis em escala. A Portaria nº 1949/2020 (Genomas Brasil) representa marco nesse processo, ao estabelecer uma rede nacional de genômica aplicada à saúde, em consonância com experiências internacionais como o *100,000 Genomes Project* e o *All of Us Research Program* (Brasil, 2020).

No campo das doenças neuroinfecciosas, estudos como os de Wilson et al. (2019) e Su et al. (2024) reforçam que a adoção da mNGS pode reduzir mortalidade e morbidade em meningites e encefalites de etiologia indeterminada, modificando condutas em até metade dos pacientes. No âmbito das doenças neurodegenerativas, as políticas públicas precisam acompanhar a rápida evolução dos biomarcadores para garantir um diagnóstico mais preciso e precoce.

A implementação de protocolos de atenção à demência, como a Linha de Cuidado da Pessoa com Alzheimer e outras Demências da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (Sesa, 2023), é um passo fundamental. A integração de biomarcadores proteicos com potenciais achados genômicos a essas linhas de cuidado é a próxima fronteira (Studart-Neto et al., 2024).

Essa necessidade é ainda mais premente quando se considera a demência como uma prioridade de saúde pública, conforme destacado no recente Relatório Nacional sobre a

Demência do Ministério da Saúde (Brasil, 2024), que projeta um aumento significativo do número de casos no país. A possibilidade de monitorar a neurodegeneração por NfL e estratificar o risco por assinaturas genômicas e epigenéticas abre espaço para um planejamento terapêutico mais individualizado, alinhado tanto com as necessidades clínicas quanto com as estratégias de saúde pública.

Outro ponto crítico é a criação de bancos nacionais de dados genômicos e metagenômicos, que refletem a diversidade da população brasileira. Hoje, a predominância de dados europeus e norte-americanos limita a interpretação de variantes em grupos sub-representados. A integração multicêntrica prevista pelo *Genomas Brasil* e pela *Rede Nacional de Sequenciamento* pode reduzir esse viés e aumentar a acurácia diagnóstica em diferentes regiões do país.

O fortalecimento de equipes multidisciplinares é igualmente estratégico. A prática clínica baseada em genômica exige atuação conjunta de médicos, microbiologistas, geneticistas, bioinformáticos, enfermeiros e psicólogos. Como ressaltam Kammermeier et al. (2023), o diagnóstico só adquire pleno valor quando traduzido em planos terapêuticos integrados e em aconselhamento familiar adequado. Essa perspectiva demanda capacitação contínua e políticas de treinamento voltadas ao SUS.

Finalmente, deve-se considerar a sustentabilidade econômica. Apesar da queda no custo do sequenciamento, a incorporação em sistemas universais requer análises robustas de custo-efetividade. Experiências como a do *National Health Service* no Reino Unido mostram que a integração é viável quando aplicada de forma seletiva, em casos de alta complexidade (Samuel; Farsides, 2007). No Brasil, a priorização de pacientes com quadros neuropsiquiátricos graves de etiologia indefinida e de síndromes genéticas raras pode ser a estratégia inicial mais adequada. Em síntese, as perspectivas futuras indicam a necessidade de investimentos em infraestrutura, formação de recursos humanos, padronização de protocolos e integração em rede.

8 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou, de forma consistente, o duplo valor, diagnóstico e estratégico, da aplicação do NGS para afecções neuropsiquiátricas e infecciosas no âmbito do SUS no Ceará. A hipótese central, que previa que a aplicação supervisionada da genômica e metagenômica geraria não apenas elucidação de casos, mas também a evidência empírica necessária para um modelo de implementação, foi plenamente corroborada pelos resultados.

O impacto diagnóstico, objetivo central da primeira fase da pesquisa, foi evidenciado pela resolutividade alcançada. Na frente genômica, a investigação em uma coorte de 17 pacientes com quadros neuropsiquiátricos complexos obteve achados clinicamente relevantes, com a elucidação da provável etiologia genética em 37,5% (3/8) da subcoorte neurológica com curadoria clínica especializada – um rendimento diagnóstico alinhado aos principais estudos da área. Em paralelo, a abordagem metagenômica provou seu valor como ferramenta de segunda linha, ao solucionar um caso de neuroinfecção em paciente que permanecia sem diagnóstico confirmatório pelos métodos convencionais, permitindo um manejo clínico direcionado e assertivo.

Contudo, a contribuição mais pragmática desta dissertação reside na transição da prova de conceito para a proposição de uma solução sistêmica. O mapeamento dos desafios operacionais, realizado por meio de pesquisa participativa com a equipe técnica, quantificou as barreiras críticas no fluxo hospital-laboratório, com destaque para a lacuna de informações clínicas (apontada por 100% dos participantes) e os riscos na fase pré-analítica. Em resposta direta a essas evidências, foi desenvolvido as bases do protocolo técnico-operacional colaborativo, que estrutura a comunicação, padroniza as etapas e formaliza a interpretação multidisciplinar. A proposta não é, portanto, um produto teórico, mas uma ferramenta desenvolvida a partir da prática e com a necessidade de posterior integração aos protocolos institucionais para sua implementação.

Dessa forma, este trabalho ofereceu um modelo translacional que articula assistência, pesquisa e vigilância. Ao consolidar um fluxo que conecta a expertise da Fiocruz Ceará aos hospitais da rede pública, a pesquisa fornece subsídios concretos para a incorporação mais ampla e equitativa da medicina de precisão no SUS. As recomendações propostas visam não apenas otimizar o diagnóstico de casos individuais, mas também fortalecer a vigilância genômica e metagenômica no estado, alinhando-se às políticas nacionais de inovação em saúde. Para o futuro, a curadoria da coorte psiquiátrica é necessária e a validação prospectiva do protocolo proposto em um estudo piloto é o próximo passo lógico, permitindo a mensuração de

seu impacto em desfechos clínicos e na otimização de custos. Adicionalmente, sugere-se a expansão da rede colaborativa e o desenvolvimento de bancos de dados genômicos regionais, que refletem a diversidade da nossa população e aumentem a acurácia da interpretação de variantes.

Conclui-se, portanto, que a integração de tecnologias de NGS ao fluxo assistencial, quando amparada por protocolos operacionais robustos e colaboração interinstitucional, transcende o diagnóstico de precisão. Ela representa um avanço estratégico para a saúde pública no Ceará, com potencial para reduzir o percurso diagnóstico de inúmeros pacientes e qualificar a resposta do sistema de saúde a doenças complexas e emergentes. Assim, esta dissertação demonstra que a integração estruturada do NGS ao SUS não apenas elucida casos complexos, mas também inaugura um modelo sustentável de medicina de precisão na saúde pública do Ceará.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-MORA, M. I. et al. Implementation of Exome Sequencing in Clinical Practice for Neurological Disorders. **Genes**, v. 14, n. 4, p. 813, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes14040813>.
- BAJAJ, J. S. et al. Cost-effectiveness of integrating gut microbiota analysis into hospitalisation prediction in cirrhosis. **GastroHep**, v. 2, n. 2, p. 79-86, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ygh2.390>.
- BLAUWKAMP, T. A. et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 663-674, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0349-6>.
- BRASIL. [Ministério da Saúde]. Portaria nº 1.949, de 4 de agosto de 2020. Altera a Portaria de Consolidação nº 5/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para instituir o Programa Nacional de Genômica e Saúde de Precisão Genomas Brasil. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, ed. 149, Seção 1, p. 87, 5 ago. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Relatório Nacional sobre a Demência**: Epidemiologia, (re)conhecimento e projeções futuras. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024.
- BROUGHTON, J. P. et al. Rapid detection of 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 using a CRISPR-based DETECTR lateral flow assay. **medRxiv**, 27 mar. 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.03.06.20032334>.
- BROWN, J. R.; BHARUCHA, T.; BREUER, J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases. **Journal of Infection**, v. 76, n. 3, p. 225-240, mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.12.014>.
- BRYZGALOV, L. O. et al. Exploring the Genetic Predisposition to Epigenetic Changes in Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 7955, abr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24097955>.
- CAGNOLI, C. et al. Missense Mutations in the AFG3L2 Proteolytic Domain Account for ~1.5% of European Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias. **Human Mutation**, v. 31, n. 10, p. 1117-1124, 2010.
- CHIANG, A. D.; DEKKER, J. P. From the Pipeline to the Bedside: Advances and Challenges in Clinical Metagenomics. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 3, p. S331-S340, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz151>.
- CHIU, C. Y.; MILLER, S. A. Clinical metagenomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, p. 341-355, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0113-7>.
- COSMOSID. **Principais técnicas de metagenômica e seus usos**. [S.l.: s.n.], 2023. Disponível em: <https://www.cosmosid.com>. Acesso em: 13 ago. 2025.
- DI NARDO, M.; KRANTZ, I. D.; MUSIO, A. Genome Instability and Senescence Are Markers of Cornelia de Lange Syndrome Cells. **Cells**, v. 13, n. 23, p. 2025, dez. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells13232025>.

DIÑEIRO, M. et al. Comprehensive genomic diagnosis of inherited retinal and optical nerve disorders reveals hidden syndromes and personalized therapeutic options. **Acta Ophthalmologica**, v. 98, n. 8, p. e1034-e1048, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/aos.14479>.

DO, T.; DENG, D.; DAME-TEIXEIRA, N. Editorial: Applications of next generation sequencing (NGS) technologies to decipher the oral microbiome in systemic health and disease, volume II. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, p. 1532762, dez. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1532762>.

DOHERTYA, K. et al. A closer look at ARSA activity in a patient with metachromatic leukodystrophy. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 19, 100460, 2019.

DUARTE, A. J. et al. Mutation Frequency of Three Neurodegenerative Lysosomal Storage Diseases: From Screening to Treatment? **Archives of Medical Research**, v. 48, n. 3, p. 263-269, 2017.

DYE, C. After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 369, n. 1645, p. 20130426, maio 2014. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0426>.

ELGÜN, S. et al. Phenotypic variation between siblings with Metachromatic Leukodystrophy. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 14, n. 1, 136, 2019.

FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 406-410, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature22401>.

FLYGARE, S. et al. Taxonomer: an interactive metagenomics analysis portal for universal pathogen detection and host mRNA expression profiling. **Genome Biology**, v. 17, n. 111, jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0969-1>.

GAO, D.; YU, Q.; WANG, G. et al. Diagnosis of a malayan filariasis case using a shotgun diagnostic metagenomics assay. **Parasites Vectors**, v. 9, n. 86, 2016. DOI <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1363-2>.

GIURGEA, I. et al. TCF4 Deletions in Pitt-Hopkins Syndrome. **Human Mutation**, v. 29, n. 11, p. E242-E251, 2008.

GRANEROD, J. et al. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 835-844, dec. 2010. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70222-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70222-X).

GOMEZ-LIRA, M. et al. Molecular genetic characterization of two metachromatic leukodystrophy patients who carry the T799G mutation and show different phenotypes; description of a novel null-type mutation. **Human Genetics**, v. 102, n. 4, p. 459-463, 1998.

GU, W. et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids. **Nature Medicine**, v. 27, p. 115-124, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1105-z>.

- GU, W.; MILLER, S.; CHIU, C. Y. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, p. 319-338, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>.
- HAN, D. *et al.* mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 5-6, p. 668-685, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1681933>.
- HASAN, M. R. *et al.* Depletion of human DNA in spiked clinical specimens for improvement of sensitivity of pathogen detection by next-generation sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 919-927, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.03050-15>.
- HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8, jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>.
- HILT, E. E.; FERRIERI, P. Next generation and other sequencing technologies in diagnostic microbiology and infectious diseases. **Genes (Basel)**, Basel, v. 13, n. 9, p. 1566, ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13091566>.
- HUANG, J. *et al.* Metagenomic next-generation sequencing versus traditional pathogen detection in the diagnosis of peripheral pulmonary infectious lesions. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 567-576, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S235182>
- JACOB, J. J.; VEERARAGHAVAN, B.; VASUDEVAN, K. Metagenomic next-generation sequencing in clinical microbiology. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 133-140, 2019. DOI: https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_19_401.
- JIA, X. *et al.* Massively parallel functional testing of MSH2 missense variants conferring Lynch syndrome risk. **American Journal of Human Genetics**, v. 108, n. 1, p. 163-175, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.12.003>.
- JIANG, Q. *et al.* Genetic analysis of and clinical characteristics associated with ANXA11 variants in a Chinese cohort with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiology of Disease**, v. 175, p. 105907, dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105907>.
- JING, C. *et al.* Clinical evaluation of an improved metagenomic next-generation sequencing test for the diagnosis of bloodstream infections. **Clinical Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 1133-1143, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab061>.
- KAMMERMEIER, J. *et al.* Genomic diagnosis and care co-ordination for monogenic inflammatory bowel disease in children and adults: consensus guideline on behalf of the British Society of Gastroenterology and British Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 3, p. 271-286, mar. 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00337-5](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00337-5).
- KAUR, M. *et al.* Genomic analyses in Cornelia de Lange Syndrome and related diagnoses: novel candidate genes, genotype-phenotype correlations and common mechanisms. **American Journal of Medical Genetics - Part A**, v. 191, n. 8, p. 2113-2131, ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63247>.

- KIRIKAE, H. et al. Two types of early epileptic encephalopathy in a Pitt-Hopkins syndrome patient with a novel TCF4 mutation. **Brain & Development**, v. 44, n. 2, p. 148-152, 2022.
- KUBASKI, F. et al. Measurement of sulfatides in the amniotic fluid supernatant: A useful tool in the prenatal diagnosis of metachromatic leukodystrophy. **JIMD Reports**, v. 63, n. 2, p. 162-167, 2022.
- KREY, I. et al. Current practice in diagnostic genetic testing of the epilepsies. **Epileptic Disorders**, v. 24, p. 765-786, ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1684/epd.2022.1448>.
- LIN, C. et al. NIT1 suppresses tumour proliferation by activating the TGF β 1-Smad2/3 signalling pathway in colorectal cancer. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 263, p. 1-12, 2018. DOI: 10.1038/s41419-018-0333-3.
- LIU, H. Y. et al. Diagnostic and clinical utility of whole genome sequencing in a cohort of undiagnosed Chinese families with rare diseases. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19365, dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55832-1>.
- LIU, Y.; MA, Y. Clinical applications of metagenomics next-generation sequencing in infectious diseases. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 25, n. 6, p. 471-484, maio 2024. DOI: <https://doi.org/10.1631/jzus.B2300029>.
- LIU, Y. X. et al. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. **Protein & Cell**, v. 12, n. 5, p. 315-330, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>.
- LUGOWSKA, A. et al. Molecular and phenotypic characteristics of metachromatic leukodystrophy patients from Poland. **Clinical Genetics**, v. 68, n. 1, p. 48-54, 2005.
- MAHDIEHA, N. et al. Novel disease-causing variants in a cohort of Iranian patients with Metachromatic Leukodystrophy and in silico analysis of their pathogenicity. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 19, 106448, 2020.
- MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 2, p. 560-564, fev. 1977. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>.
- MILLER, S. et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid. **Genome Research**, v. 29, n. 5, p. 831-842, maio 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.238170.118>.
- MU, S. et al. Prospective evaluation of a rapid clinical metagenomics test for bacterial pneumonia. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 684965, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.684965>.
- NACCACHE, S. N. et al. A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples. **Genome Research**, v. 24, n. 7, p. 1180-1192, jul. 2014. DOI: 10.1101/gr.171934.113. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.171934.113>.

NADELLA, R. K. et al. Identification and functional characterization of two novel mutations in KCNJ10 and PI4KB in SESAME syndrome without electrolyte imbalance. **Human Genomics**, v. 13, n. 53, p. 1-13, 2019. DOI: 10.1186/s40246-019-0236-0.

NATH, A.; SMITH, B. R.; THAKUR, K. T. Major advances in neuroinfectious diseases in the past two decades. **The Lancet Neurology**, v. 21, p. 308-310, abr. 2022. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00093-X).

NELSON, M. T. et al. Human and extracellular DNA depletion for metagenomic analysis of complex clinical infection samples yields optimized viable microbiome profiles. **Cell Reports**, v. 26, n. 8, p. 2227-2240, fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.091>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **OMS e parceiros pedem ação urgente contra a meningite**. OPAS, 28 set. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/28-9-2021-oms-e-parceiros-pedem-acao-urgente-contra-meningite>. Acesso em: 24 set. 2025.

PAREKH, M. et al. Shotgun sequencing to determine corneal infection. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**, v. 19, p. 100737, maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajoc.2020.100737>.

PEREIRA, Diana Nogueira. **Meningites bacterianas**. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

PERKOVIC, M. N. et al. Epigenetics of Alzheimer's disease. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 195, jan. 2021. DOI: 10.3390/biom11020195. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom11020195>.

PIANTADOSI, A. et al. Enhanced virus detection and metagenomic sequencing in patients with meningitis and encephalitis. **mBio**, v. 12, n. 4, p. e0114321, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01143-21>.

POPP, B. et al. The recurrent TCF4 missense variant p.(Arg389Cys) causes a neurodevelopmental disorder overlapping with but not typical for Pitt-Hopkins syndrome. **Clinical Genetics**, v. 102, n. 6, p. 517-523, 2022.

QUICK, J. et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. **Nature**, v. 530, n. 7589, p. 228-232, fev. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature16996>.

RUTTEN, J. W. et al. Bi-allelic NIT1 variants cause a brain small vessel disease characterized by movement disorders, massively dilated perivascular spaces, and intracerebral hemorrhage. **Genetics in Medicine**, v. 26, n. 101105, p. 1-11, 2024. DOI: 10.1016/j.gim.2024.101105.

SALTER, S. J. et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. **BMC Biology**, v. 12, p. 87, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>.

SALZBERG, S. L. *et al.* Next-generation sequencing in neuropathologic diagnosis of infections of the nervous system. **Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 3, n. 4, p. e251, jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000251>.

SAMUEL, Gabrielle Natalie; FARSIDES, Bobbie. The UK's 100,000 Genomes Project: manifesting policymakers' expectations. **New Genetics and Society**, Abingdon, v. 36, n. 4, p. 336-353, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/14636778.2017.1370671>.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.¹ **Journal of Molecular Biology**, v. 94, n. 3, p. 441-448, maio 1975. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2).

SCHATZ, M. C.; DELCHER, A. L.; SALZBERG, S. L. Assembly of large genomes using second-generation sequencing. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1165-1173, set. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.101360.109>.

SCHILLING, L. P. *et al.* Diagnóstico da doença de Alzheimer: recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 25-39, set. 2022.

SESA. **Linha de Cuidado da Pessoa com Doença de Alzheimer e outras Demências**. Fortaleza: Secretaria da Saúde do Ceará, 2023.

SLOMNICKI, L. P. et al. Nucleolar Enrichment of Brain Proteins with Critical Roles in Human Neurodevelopment. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 6, p. 2055-2075, 2016.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Molecular diagnostic yield of exome sequencing and chromosomal microarray in cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. **JAMA Neurology**, v. 79, n. 12, p. 1287-1295, dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2022.3549>.

STRONG, M. J. *et al.* Microbial contamination in next generation sequencing: implications for sequence-based analysis of clinical samples. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 11, p. e1004437, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004437>.

STUDART-NETO, A. *et al.* Diretrizes para o uso e interpretação dos biomarcadores da doença de Alzheimer na prática clínica no Brasil: recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 18, e20240001, 2024

SU, L. D. *et al.* Clinical metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of central nervous system infections: advances and challenges. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 28, n. 5, p. 513-523, set. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40291-024-00727-9>.

TAKAHASHI, K. *et al.* Deep-Sequence Identification and Role in Virus Replication of a JC Virus Quasispecies in Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. **Journal of Virology**, v. 91, n. 1, p. e01335-16, dez. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01335-16>.

TAKANO, K. *et al.* Two percent of patients suspected of having Angelman syndrome have TCF4 mutations. **Clinical Genetics**, v. 78, n. 3, p. 282-288, 2010.

TEIVE, H. A. G. *et al.* As contribuições de Charcot e de Marsden para o desenvolvimento dos distúrbios do movimento nos séculos XIX e XX. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 59, n. 3-A, p. 633-636, set. 2001.

THOMAS, T. *et al.* Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 3, abr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>.

TUNC, S. et al. Spinocerebellar Ataxia Type 28-Phenotypic and Molecular Characterization of a Family with Heterozygous and Compound-Heterozygous Mutations in AFG3L2. **The Cerebellum**, v. 18, p. 817-822, 2019.

VAN DIJK, E. L. *et al.* The third revolution in sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 9, p. 666-681, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>.

VASEN, H. F. A. *et al.* Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). **Journal of Medical Genetics**, London, v. 44, n. 6, p. 353-362, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.048991>.

WANG, Y. *et al.* Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. **Nature Biotechnology**, v. 39, p. 1348-1365, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>.

WANG, Y. *et al.* ANXA11 mutations are associated with amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia. **Frontiers in Neurology**, v. 13, p. 886887, set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.886887>.

WATSON, S. *et al.* Cross-sectional analysis of exome sequencing diagnosis in patients with neurologic phenotypes facing barriers to clinical testing. **Neurology Genetics**, v. 10, n. 3, p. e200133, abr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000200133>.

SHI, Y. *et al.* A case of chlamydia psittaci caused severe pneumonia and meningitis diagnosed by metagenome next-generation sequencing and clinical analysis: a case report and literature review. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 621, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06205-5>.

WILSON, M. R. *et al.* Chronic meningitis investigated via metagenomic next-generation sequencing. **JAMA Neurology**, v. 75, n. 8, p. 947-955, ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0463>.

WILSON, M. R. *et al.* Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 24, p. 2327-2340, jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1803396>.

XIA, H. *et al.* Progressive multifocal leukoencephalopathy diagnosed by metagenomic next-generation sequencing of cerebrospinal fluid in an HIV patient. **Frontiers in Neurology**, v. 10, p. 1202, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01202>

XING, X. W. *et al.* Metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of infectious encephalitis and meningitis: a large, prospective case series of 213 patients. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 88, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00088>.

YANG, L. *et al.* Metagenomic next-generation sequencing for pulmonary fungal infection diagnosis: lung biopsy versus bronchoalveolar lavage fluid. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 4333-4359, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S333818>.

ZHANG, L. *et al.* Advances in metagenomics and its application in environmental microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 766364, dez. 2021. DOI: [https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364..](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364)

ZHANG, Y. *et al.* Clinical application and evaluation of metagenomic next-generation sequencing in suspected adult central nervous system infection. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 199, maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02360-6>.

ZHU, X. *et al.* Identification of pathogens in HIV-infected patients using metagenomic next-generation sequencing (mNGS) as compared to conventional microbiological tests (CMTs). **Infection and Drug Resistance**, v. 18, p. 929-940, fev. 2025. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S491946>.

ZÜHLKE, C. et al. Spinocerebellar ataxia 28: a novel AFG3L2 mutation in a German family with young onset, slow progression and saccadic slowing. **Cerebellum & Ataxias**, v. 2, n. 19, 2015.

APÊNDICE A - ESTRATÉGIA DE REVISÃO DE LITERATURA

1. Objetivo do Levantamento: analisar a literatura científica sobre as aplicações de genômica e metagenômica diagnóstica em neuropatias e doenças infecciosas com suspeita etiológica inicialmente indefinida por métodos convencionais.

2. Bases de Dados Consultadas:

- Portal de Periódicos Capes
- Ebsco
- Science Direct
- Pubmed
- Biblioteca Virtual em Saúde (BVS)

3. Estratégia de Busca e Descritores Utilizados: a estratégia de busca foi construída a partir de blocos de descritores combinados com operadores booleanos (AND/OR). Os principais blocos foram:

- #1 (Tecnologias): "genomic diagnosis"[Title] OR "metagenomic diagnosis"[Title] OR "genomic diagnose"[tiab] OR "metagenomic diagnose"[tiab]
- #2 (Metagenômica): "Metagenomics"[MeSH Terms] OR "Environmental Genomics"[All Fields]
- #3 (Genômica): "Genomics"[MeSH Terms] OR "Comparative Genomics"[Title/Abstract]
- #4 (Diagnóstico): "Diagnosis"[MeSH Terms] OR "Diagnoses"[Title/Abstract]
- #5 (Doenças Neurológicas): "Nervous System Diseases"[Mesh] OR "Neurological Disorders"[tiab]
- #6 (Doenças Infecciosas): "Communicable Diseases"[Mesh] OR "Infectious Diseases"[tiab]

As combinações foram realizadas para maximizar a cobertura da busca (e.x., #1 AND #5; #2 AND #4 AND #6).

4. Critérios de Inclusão e Exclusão: foram filtrados artigos publicados nos últimos 7 anos (artigos de revisão, ensaios clínicos, relatos de casos, entre outros), em quaisquer idiomas. Após seleção, foi feita leitura do título e resumo para verificação de pertinência a este estudo ou não, sendo excluídos os que não trouxeram a metagenômica e a genômica como estratégias diagnósticas para casos de etiologia não definida por métodos convencionais.

APÊNDICE B – ESTIMATIVA RÁPIDA: QUESTÕES NORTEADORAS

1) Etapa pré-analítica:

- Quais são, na sua visão, as principais dificuldades relacionadas à chegada e preparo das amostras?
- O que você considera que mais atrapalha ou compromete a qualidade nesse momento?
- Que mudanças você sugere para melhorar esta etapa?

2) Etapa analítica:

- Quais são os maiores desafios enfrentados durante a execução das análises?
- Existe algum recurso ou treinamento que você sente falta para desempenhar melhor sua função?
- Que ajustes poderiam tornar essa etapa mais eficiente e segura?

3) Etapa pós-analítica:

- O que costuma dificultar a liberação, interpretação ou comunicação dos resultados?
- Como você percebe a interação com a equipe clínica após a emissão dos laudos?
- Que sugestões você daria para melhorar essa parte do processo?

4) Visão integradora:

- Em sua opinião, qual é a principal barreira para melhorar todo o processo (do pré ao pós-analítico)?
- O que você acha que já funciona bem e deve ser mantido?
- Descreva qual etapa do processo você acompanha mais de perto.

APÊNDICE C – RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DE EXOMA

Tabela C1. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 1 pela *Franklin/Genoxx* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
WWP1	c.2234A>G	Heterozigoto	Patogênica	Autismo
PRPH2	c.623G>A	Heterozigoto	Patogênica	Distrofia Coroide Central Areolar 2; Distrofia Macular Padrão 1; Distrofia Macular Viteliforme 3
CACNA1S	c.2365C>T	Heterozigoto	Provavelmente Patogênica	Susceptibilidade à Paralisia Periódica Tirotóxica 1; Susceptibilidade à Hipertermia Maligna; Paralisia Periódica Hipocalêmica
TRPV6	c.881_882del	Heterozigoto	Provavelmente Patogênica	Hipomagnesemia Intestinal 1; Pancreatite; Hiperparatireoidismo Transitório
CFHR5	p.E163Rfs*35	Heterozigoto	Provavelmente Patogênica	Glomerulonefrite C3

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C2. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 2 pela *Franklin/Genoxx* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
TCF4	c.1822C>T	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Distrofia Corneana de Fuchs; Síndrome de Pitt-Hopkins; Pitt-Hopkins
HLA-DRB1	c.100+1G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Susceptibilidade à Esclerose Múltipla; Sarcoidose; Autismo
SERPINA6	c.1165G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Deficiência de Globulina Ligadora de Corticosteroides;
LPA	c.3120del	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Lócus de Traço Quantitativo de Lipoproteína

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C3. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 3 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
SERPINC1	c.1246G>T	Heterozigoto	Patogênica	Deficiência Hereditária de Antitrombina Síndrome de Bart-Pumphrey; Síndrome de Ceratite-Ictiose-Perda Auditiva, Autossômica Dominante; Perda Auditiva Não-Sindrômica, Autossômica Recessiva 1A
GJB2	c.101T>C	Heterozigoto	Patogênica	Hipotonía Infantil com Retardo Psicomotor e Facies Características 1; Contraturas Congênitas dos Membros e Face, Hipotonía e Atraso do Desenvolvimento; Epilepsia do Lobo Temporal Relacionada ao NALCN
NALCN	c.4949G>C	Heterozigoto	Variante de significado incerto	

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C4. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 4 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
CFTR	c.1210-11T>G	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Aplasia Bilateral Congênita dos Vasos Deferentes por Mutação em CFTR; Pancreatite Crônica Hereditária; Bronquiectasia com ou sem Cloro Elevado no Suor 1 Transtorno do Neurodesenvolvimento Relacionado a Sp9 com/sem Encefalopatia Epiléptica; Transtorno Neurodesenvolvimento Complexo
SP9	c.1190G>C	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C5. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 5 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
F2	c.*97G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Perda Gestacional Recorrente, Susceptibilidade 2; Trombofilia Devida a Defeito da Trombina;

				Deficiência Congênita de Protrombina
NPC1	c.1280C>G	Heterozigoto	Variante de significado incerto	Doença de Niemann-Pick, Tipo C1; Doença de Niemann-Pick Tipo C, Início Neurológico no Final da Infância

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C6. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 6 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
EXT2	c.998A>G	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Síndrome de Convulsões-Escoliose-Macrocefalia; Exostoses Múltiplas, Tipo 2
NARS	c.1067A>C	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Transtorno do Neurodesenvolvimento com Microcefalia, Linguagem Prejudicada, Epilepsia e Anormalidades da Marcha
SLC3A1	c.754C>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Cistinúria
LPA	c.3288-2A>G	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Lócus de Traço Quantitativo da Lipoproteína

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C7. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 7 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
HBB	c.19G>A	Heterozigoto	Patogênica	Anemia por Corpúsculos de Heinz; Beta-talassemia Dominante; Suscetibilidade à Malária
ARSA	c.465+1G>A	Heterozigoto	Patogênica	Leucodistrofia Metacromática, Forma Juvenil
BTD	c.281G>T	Heterozigoto	Patogênica	Deficiência de Biotinidase; Síndrome de Leigh

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C8. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 8 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
FLG	c.5717Cg>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Dermatite Atópica, Tipo 2; Ictiose Vulgar Autossômica Dominante; Ictiose Recessiva Ligada ao X

SMPD1	c.605G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Doença de Niemann-Pick Tipo A e Tipo B
--------------	----------	--------------	--------------------------	--

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C9. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 9 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
ABCA4	c.2930C>T	Heterozigoto	Patogênica	Retinite Pigmentosa 19; Degeneração Macular Relacionada à Idade 2; Distrofia de Cones e Bastonetes 3
OXGR1	c.136G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Nefrolitíase por Oxalato de Cálcio, Tipo 2, Com ou Sem Nefrocalcinose

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C10. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 10 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
CLCN1	c.2680C>T	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Miotonia Congênita, Autossômica Recessiva; Miotonia Congênita, Autossômica Dominante; Miotonia-
COL9A3	c.488G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Displasia Epifisária Múltipla, Tipo 3; Síndrome de Stickler, Tipo 6; Distúrbio Degenerativo do Disco Intervertebral
RYR2	c.2711A>G	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Arritmias Ventriculares Devidas à Síndrome de Deficiência na Liberação de Cálcio pelo Receptor de Rianodina Cardíaco; Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica Tipo 1

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C11. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 11 pela *Franklin/Genoxx* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
GATA3	c.826C>T	Heterozigoto	Patogênica	Síndrome de Hipoparatireoidismo-Surdez-Doença Renal
SPG7	c.376G>C	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Paraplegia Espástica Hereditária Tipo 7
MP0	c.2031-2A>C	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Doença de Alzheimer Tipo 1; Deficiência de Mieloperoxidase; Psoríase Pustulosa Generalizada Relacionada à MPO
AFG3L2	c.1985T>G	Heterozigoto	Variante de Significado Incerto	Ataxia espástica 5; Ataxia espástica 5; Ataxia espinocerebelar tipo 28; Atrofia óptica 12; Retinose pigmentar 1;

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C12. Principais variantes patogênicas detectadas no paciente 12 e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
HLA-DRB1	c.100+1G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Esclerose múltipla, suscetibilidade 1; Sarcoidose, suscetibilidade 1; Autismo;
NIT1	c.883C>T	Homozigoto	Provavelmente patogênica	Doença de pequenos vasos cerebrais 4
COL10A1	c.1300G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Condrodisplasia Metafisária de Schmid
MSH2	c.1571G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Síndrome de Lynch 1; Síndrome do Câncer por Defeito de Reparo de Mismatch 2; Síndrome de Muir-Torre

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C13. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 13 pela *Franklin/Genoxx* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
BCO1	c.2510G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Hipercarotenemia Hereditária e

Deficiência de Vitamina
A

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C14. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 14 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
SLC5A2	c.1566C>A	Heterozigoto	Patogênica	Glicosúria Renal Familiar
TYR	c.915C>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Albinismo Oculocutâneo Tipo 1a; Variação na Pigmentação da Pele/Cabelo/Olhos, Tipo 3; Albinismo Oculocutâneo Tipo 1b

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C15. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 15 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
SLC37A4	c.1042_1043del	Heterozigoto	Patogênica	Doença de Depósito de Glicogênio Tipo Ib; Distúrbio Congênito da Glicosilação, Tipo IIw; Doença de Depósito de Glicogênio Tipo I
SAMD9	c.2053C>T	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Calcinose Tumoral Familiar Normofosfatêmica; Síndrome de Mielodisplasia e Leucemia com Monossomia 7, Tipo 2; Síndrome Mirage

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C16. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 16 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

Gene	Variante	Zigosidade	Classificação	Condições associadas
Serpinc1	C.1246g>t	Heterozigoto	Patogênica	Deficiência hereditária de antitrombina
Rab32	C.320a>g	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Doença de parkinson 26, autossômica dominante, suscetibilidade (park26)
Hla-drb1	C.100+1g>a	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Esclerose múltipla, suscetibilidade 1; sarcoidose, suscetibilidade 1

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C17. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 17 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

Gene	Variante	Zigosidade	Classificação	Condições associadas
Col9a2	C.19g>a	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Síndrome de stickler, tipo 5; displasia epifisária múltipla, tipo 2
Rp9	C.340c>t	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Retinite pigmentosa 9

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C18. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 18 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
PAH	c.1066-11G>A	Heterozigoto	Patogênica	Fenilcetonúria; Autismo
RP9	c.340C>T	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Retinite Pigmentosa 9 (RP9)
PROS1	c.1501T>C	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Trombofilia Devida à Deficiência de Proteína S, Autossômica Recessiva; Trombofilia Devida à Deficiência de Proteína S, Autossômica Dominante; Deficiência de Proteína S
SCN1A	c.5770C>T	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Encefalopatia do Desenvolvimento e Epiléptica, Tipo 6; Encefalopatia do Desenvolvimento e Epiléptica, Tipo 6; Epilepsia Generalizada com Crises Febris Plus, Tipo 2
ANXA11	c.282dup	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Miopia por Corpúsculos de Inclusão e Anormalidades da Substância Branca Cerebral; Esclerose Lateral Amiotrófica Tipo 23; Esclerose Lateral Amiotrófica

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Tabela C19. Principais variantes candidatas detectadas no paciente 19 pela *Franklin/Genoox* e respectivas condições clínicas associadas.

GENE	VARIANTE	ZIGOSIDADE	CLASSIFICAÇÃO	CONDIÇÕES ASSOCIADAS
WFS1	c.962C>G	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Síndrome de Wolfram 1; Síndrome Semelhante à de Wolfram; Perda Auditiva Não

				Sindrômica Autossômica Dominante 6
HLA- DRB1	C.303_304del	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Esclerose Múltipla, Suscetibilidade 1; Sarcoidose, Suscetibilidade 1; Autismo
CFTR	c.358G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Aplasia Congênita Bilateral dos Ductos Deferentes por Mutação no CFTR; Pancreatite Crônica Hereditária; Bronquiectasia com ou sem Cloro Elevado no Suor 1
F2	c.*97G>A	Heterozigoto	Provavelmente patogênica	Perda Gestacional Recorrente, Suscetibilidade 2; Trombofilia Devida a Defeito na Trombina; Deficiência Congênita de Protrombina

Fonte: elaborado pelo autor (2025).