



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

GEÓRGIA FERNANDA DE OLIVEIRA

Investigação Molecular de PBMAH Familiar Sem Causa Genética Esclarecida

Recife
2024

GEÓRGIA FERNANDA DE OLIVEIRA

Investigação Molecular de PBMAH Familiar Sem Causa Genética Esclarecida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador(a): Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador(a): Fábio Rueda Faucz

Recife

2024

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Oliveira, Georgia Fernanda de
Investigação molecular de PBMAH familiar sem causa genética esclarecida. / Georgia Fernanda de Oliveira . – 2024.

58 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra.
Coorientadora: Fábio Rueda Faucz.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, 2024.

Inclui referências.

1. Cushing. 2. WGS. 3. Análise de qualidade. 4. Processamento de bioinformática. I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (Orient.). II. Faucz, Fábio Rueda (Coorient.). III. Título.

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-178

GEÓRGIA FERNANDA DE OLIVEIRA

Investigação Molecular de PBMAH Familiar Sem Causa Genética Esclarecida
Área de Concentração:

Aprovado em 26 / 03 / 2024

Banca Examinadora

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Wilson José da Silva Júnior
Entomology Department and Bioinformatic Core Facility
Aggeu Magalhães Institute (IAM) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Dr. Juan Luiz Coelho
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2024

Aos meus pais e avós (in memoriam), que foram exemplos de perseverança, luta e esperança. Através de seus ensinamentos, entendi que poderia ultrapassar os limites que me foram impostos. Graças a vocês, cheguei até aqui e continuarei a ir além. levando-os sempre comigo em meu coração e memórias

AGRADECIMENTOS

Uma etapa se encerra (finalmente!) e não poderia deixar de agradecer a tantas pessoas que estiveram ao meu lado durante esta jornada, seja durante todo o percurso ou apenas em uma passagem rápida. Cada um de vocês fez toda a diferença nos meus dias.

Primeiramente, aos meus pais, que são exemplos de dedicação e persistência, e sempre confiaram em mim (ou pelo menos disfarçaram bem, obrigada!). À minha irmã Geovana, pelo apoio constante, pelos momentos de calma, pelo colinho amigo e pelos pães quentinhos. Ao meu companheiro Rodrigo, pela parceria na vida e na ciência, pelas explicações, pelas madrugadas adentro e pela paciência nas vezes em que troquei o RPG pela escrita (risos).

Aos meus fofinhos gatos e coelho - Luna, Oliver e Tsuki (sim, eles merecem ser mencionados) - por entenderem as vezes em que precisei de silêncio ou de uma pausa, e por virem no meu colo me dar carinho, provando que subestimamos sua capacidade de sentir e compreender.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes, mesmo a quilômetros de distância: Fernanda, Júlio, Vilas, Suelma, Lucas, Káritas, Ayslan, Deborah, Vanessa, Cheysa, Mano, Daniel e Cris. Vocês foram como um ar fresco nos momentos difíceis e alegria enorme nos reencontros.

Rafa e Lay, obrigada por me aguentarem todo santo dia falando besteira no Whats, por ouvirem minhas reclamações e divagações. Vocês foram guerreiras e nunca me abandonaram. Carol e Giovanna, minhas companheiras de turma e de trajetória, sou grata e feliz por tê-las encontrado e por compartilhar esta estrada com vocês. Wilson, obrigada pelos ensinamentos em Bioinfo e pelas correções sempre com leveza e muitas risadas.

Cesar, muito obrigada pelo acolhimento, por viajar nas minhas loucuras e por me presentear com grandes lições delas.

Aos demais familiares, amigos, professores e colegas de trabalho, tanto recentes quanto antigos, que estiveram ao meu lado e, sem saber, contribuíram para que tudo desse certo. Seja com um meme, uma risadinha, uma palavra de apoio, uma comida deliciosa ou simplesmente por existirem, vocês foram fundamentais.

Aos professores, por aceitarem o desafio e por enfrentarem todos os percalços até o fim.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

A hiperplasia adrenal macronodular bilateral primária (PBMAH) é um subtipo raro da Síndrome de Cushing (SC) caracterizado pelo surgimento de macronódulos adrenais bilaterais com mais de 10 mm de diâmetro. Sua variabilidade fenotípica e a presença de SC subclínica - ausência de fenótipo característico de hipercortisolismo - sugerem que a prevalência de PBMAH familiar é subestimada, principalmente devido às dificuldades do seu diagnóstico.

Neste estudo, foi utilizado o Sequenciamento do Genoma Completo (WGS) para investigar possíveis fatores genéticos em uma família com PBMAH e negativos para variantes patogênicas no gene ARMC5 (principal gene associado a casos familiares da doença). O WGS oferece um panorama detalhado de diversos tipos de alterações genéticas e embora represente um maior custo inicial, reduz a necessidade de processamentos subsequentes com outras técnicas. Isso não apenas agiliza o diagnóstico como também minimiza manipulações das amostras, diminuindo os riscos associados.

A análise dos dados de sequenciamento revelou que a baixa qualidade do material e limitações da técnica de Repli-g comprometeram significativamente a precisão dos resultados. Apesar dessas limitações, foi realizada uma avaliação criteriosa dos dados de sequenciamento obtidos, utilizando ferramentas de análise de dados genéticos. Com isso, foi possível levantar pontos relevantes de discussão sobre o presente estudo, incluindo a escolha de metodologias de bancada, manipulação de amostras e verificação dos dados de sequenciamento.

Palavras-chave: Cushing; WGS; Análise de Qualidade; Processamento de Bioinformática

ABSTRACT

Primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia (PBMAH) is a rare subtype of Cushing's syndrome (CS) characterized by the emergence of bilateral adrenal macronodules with a diameter greater than 10 mm. Its phenotypic variability and the presence of subclinical CS - absence of the characteristic phenotype of hypercortisolism - suggest that the prevalence of familial PBMAH is underestimated, mainly due to difficulties in its diagnosis.

In this study, Whole Genome Sequencing (WGS) was used to investigate possible genetic factors in a family with PBMAH and negative for pathogenic variants in the ARMC5 gene (the main gene associated with familial cases of the disease). WGS provides a detailed overview of various types of genetic alterations and, although it represents a higher initial cost, it reduces the need for subsequent processing with other techniques. This not only speeds up diagnosis but also minimizes sample manipulations, reducing associated risks. The analysis of the sequencing data revealed that the low quality of the material and limitations of the Repli-g technique significantly compromised the accuracy of the results. Despite these limitations, a thorough evaluation of the obtained sequencing data was performed, using genetic data analysis tools. This enabled the raising of relevant discussion points about the present study, including the choice of bench methodologies, sample manipulation, and verification of sequencing data.

Keywords: Cushing; WGS; NGS Quality Analysis; Bioinformatics Processing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Figura 1: A -Características físicas SD antes do tratamento; B - Pós-tratamento (NIES et al. 2002)	Página 20
Figura 2 - A - Incidentalomas Bilaterais; B:- Glândulas pós remoção cirúrgica contendo em seu interior diversos macronódulos (Nies et al. 2002)	Página 23
Figura 3 - Glândula Adrenal e suas zonas ampliadas. Fonte: https://www.sanarmed.com/resumo-sobre-glandulas-adrenais-anatomia-histologia-hormonios-e-doencas .	Página 26
Figura 4 - Resumo gráfico descoberta da PBMAH através dos incidentalomas (Bertherat et al. 2023)	Página 29
Figura 5 - Ativação da via cAMP. Fonte: Autor	Página 32
Figura 6 - Heredograma – Disponibilizado por colaboradores do estudo	Página 42
Figura 7 - Fluxo de trabalho do preparo de biblioteca Illumina® TruSeq® DNA PCR-Free.	Página 44
Figura 8 - Visualização dos dados no IGV - discrepância de cobertura.	Página 52
Figura 9 - Visualização dos dados no IGV – Dímeros de Primers	Página 52
Figura 10 - Visualização dos dados no IGV – Dímeros de Primers	Página 53
Figura 11 - Visualização dos dados no IGV – Evidências de contaminação das amostras	Página 54
Figura 12 - Visualização dos dados no IGV – Evidências de contaminação das amostras	Página 54
Figura 13 - Visualização no IGV do gene ARMC5 e sua cobertura em 3 amostras	Página 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições sobrepostas e características clínicas da síndrome de Cushing Adaptado de:(Nieman <i>et al.</i> 2008)	página 21
Tabela 2 - Heredograma – descrição da correlação entre parentesco e membros afetados	página 42
Tabela 3 - Versões Emedgene	página 47
Tabela 4 - Média de cobertura	página 51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACMG - Colégio Americano de Genética Médica e Genômica
ACTH - Hormônio Adrenocorticotrópico
AMPc ou cAMP - Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico
BAM - Binary Alignment/Map
cAMP/PKA - AMP cíclico/Proteína Quinase A
ClinGen - Clinical Genome Resource
CNVs - Alterações no Número de Cópias
CREB/ATF2 - Fatores de Transcrição da Família CREB/ATF2
DIR - Divisão de Pesquisa Intramural
EPIs - Equipamentos de Proteção Individual
GATK - Genome Analysis Toolkit
GPCR - Receptor Acoplado à Proteína G
GPCRs - Receptores Acoplados à Proteína G
IAs - Incidentalomas Adrenais
IGV - Integrated Genome Viewer
MC2R - Receptor de Melanocortina 2
MDA - Multiple Displacement Amplification
MGL - Molecular Genetics Laboratory
miRNAs - MicroRNAs,
NFA e CPA - Adenomas adrenocorticais não funcionantes e produtores de cortisol, respectivamente
NGS - Sequenciamento de Nova Geração
NIH - National Institutes of Health
PBMAH - Hiperplasia Adrenal Macronodular Bilateral Primária
PRKAC - Subunidades catalíticas da Proteína Quinase A
PRKAR - Subunidades reguladoras da Proteína Quinase A
SAM - Sequence Alignment/Map
SC - Síndrome de Cushing
SCA - Secreção Cortisol Autônoma
SEGEN - Section on Genetics & Endocrinology
SVs - Variantes Estruturais
VCF - Variant Call Format
WGS - Sequenciamento do Genoma Completo
WGS - Sequenciamento do Genoma Completo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo geral	15
1.1.2 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Síndrome de Cushing e Hiperplasia Adrenal Macronodular Bilateral Primária (PBMAH)	16
2.1.1 Síndrome de Cushing	16
2.1.2. Hiperplasia Adrenal Macronodular Bilateral Primária (PBMAH)	18
2.2 Fisiopatologia e Implicações Clínicas da PBMAH.....	20
2.2.1. Glândulas Adrenais	20
2.2.2 Mecanismos Fisiopatológicos	21
2.2.3 Lesões Adrenocorticais	21
2.2.4 Incidentalomas adrenais	22
2.3 Aspectos Moleculares da PBMAH	23
2.3.1 Via cAMP/PKA	23
2.3.2 Aspectos Genéticos da PBMAH	25
2.4 WGS, Processamento e Análise de Dados.....	27
2.4.1 Sequenciamento do Genoma Completo – WGS	27
2.4.2 Processamento e Análise dos Resultados	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Amostras, extração e quantificação	30
3.2 Repli-G.....	31
3.3 Fragmentação do DNA genômico.....	31
3.4 Reparo das extremidades, adenilação e seleção do tamanho da biblioteca	32
3.5 Ligação do DNA aos adaptadores e purificação	32
3.6 Checagem e controle de qualidade da biblioteca	32
3.7 Sequenciamento no Sistema NovaSeq 6000	33
3.8 Processamento de dados e análise de bioinformática	33
3.9 Análise dos dados e variantes obtidos.....	35
4 RESULTADOS.....	36
5 DISCUSSÃO	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
7 REFERÊNCIAS.....	45
8 CURRÍCULO LATTES DURANTE O VÍNCULO COM O PPGGBM	48

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Cushing (SC) é uma condição endócrina rara que surge após a exposição prolongada a níveis elevados de cortisol. Apesar da etiologia da doença não estar clara, este desequilíbrio hormonal associado ao surgimento da SC pode ser desencadeado por fatores ambientais, tais como o uso crônico de medicamentos glicocorticoides, assim como através do surgimento de tumores na glândula adrenal ou na glândula pituitária. A falta de aprofundamento na investigação da causa raiz com somente o diagnóstico isolado dos sintomas decorrentes da doença contribui para o sub diagnóstico, tratamentos menos eficazes e consequente progressão não controlada dos sintomas destacando a importância de abordagens mais abrangentes na identificação e tratamento desta doença.

Dentre as etiologias desta síndrome, destaca-se a Hiperplasia Adrenal Macronodular Bilateral Primária (PBMAH), descrita pela primeira vez em 1964. Esta hiperplasia é caracterizada pelo surgimento de macronódulos adrenais bilaterais com mais de 10 mm de diâmetro e aumento da secreção de cortisol. A PBMAH é considerada um subtipo raro da Síndrome de Cushing presente em menos de 1% dos casos, no entanto, a incidência destes macronódulos é ainda mais subdiagnosticada principalmente pela sua dificuldade de identificação. Geralmente a hiperplasia progride lentamente e ocorre em indivíduos com cerca de 40 a 70 anos de idade. Uma hipótese levantada para explicar a lenta progressão da PBMAH é o aumento da produção gradual de cortisol durante o surgimento dos macronódulos devido a falhas na cascata de sinalização proteica da via do AMP cíclico (cAMP).

Acreditava-se que a maioria dos tumores adrenocorticais possuíam apenas um background esporádico sem uma relação direta familiar, no entanto, atualmente há um reconhecimento crescente na comunidade científica de que estas síndromes possuem grande influência genética e alterações herdadas em genes específicos também podem desempenhar um papel em sua patogênese. Um bom exemplo disso é a recente descoberta de variantes em células de linhagem germinativa em ARMC5 em indivíduos com PBMAH, desafiando a antiga crença de que essa era uma doença esporádica. Estudos destacam também a presença de variantes em outros genes em casos familiares de SC, evidenciando a importância da genética na predisposição para essa condição.

A compreensão das bases genéticas da Síndrome de Cushing e da PBMAH podem auxiliar a solucionar casos familiares complexos. A utilização do sequenciamento do genoma

completo (WGS) é uma peça-chave para aumentar as chances de identificar a etiologia molecular deste tipo de doença. Somente uma técnica completa que avalia uma grande quantidade de tipos de alterações em todos os genes de forma simultânea pode ajudar a solucionar o surgimento de doenças complexas. Utilizando análises de segregação familiar completas, a identificação das variantes de riscos hereditários são fundamentais no aconselhamento genético a portadores assintomáticos. Adicionalmente, entender estas bases genéticas pode auxiliar no aprimoramento do diagnóstico clínico precoce, na prevenção e no manejo eficaz de complicações tardias e no potencial de personalização das estratégias terapêuticas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Analisar o genoma de uma família com PBMAH em busca de variantes em genes específicos ou em vias metabólicas envolvidas na patogênese que possam ser relacionados à condição, no intuito de contribuir para melhor caracterização da doença e a identificação clínica de pacientes de forma mais precoce.

1.1.2 Objetivos específicos

- Sequenciamento do genoma de 12 indivíduos de uma família com membros afetados e que são negativos para variantes no gene ARMC5;
- Avaliação da qualidade do material sequenciado;
- Avaliação de parentesco comparado com heredograma entre os membros da família para análise de qualidade do procedimento;
- Identificação de possíveis variantes que segregam entre os membros afetados e possíveis portadores silêncios;
- Tentar identificar ou descartar outros possíveis cofatores genéticos que podem estar associados a via metabólica em estudo;
- Avaliar a correlação entre os achados identificados e a possível diversidade de penetrância do fenótipo entre os indivíduos.

Observação: Neste estudo foi sequenciado apenas o material genético de sangue periférico com o intuito de encontrar variantes herdáveis e não foram avaliadas variantes de origem somática em tecido tumoral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síndrome de Cushing e Hiperplasia Adrenal Macronodular Bilateral Primária (PBMAH)

2.1.1 Síndrome de Cushing

A Síndrome de Cushing, caracterizada por um estado hiperadrenocorticotrófico crônico, é um distúrbio endócrino e metabólico complexo causado primordialmente pela produção excessiva de cortisol pelas glândulas adrenais (ZHOU *et al.* 2019).

As manifestações clínicas são extensas, incluindo características físicas clássicas tais como obesidade central e acúmulo de gordura na região das costas e pescoço, faces em forma de lua cheia e estrias violáceas (Figura 1 A). As características físicas marcantes tendem a desaparecer pouco tempo após o tratamento seja ele cirúrgico ou medicamentoso (Figura 1 B) (NIES *et al.* 2002). No entanto, dado o fato do diagnóstico clínico geralmente ser tardio, como por consequente ocorre o surgimento da síndrome metabólica e algumas comorbidades necessitam de cuidados por toda a vida (CHARCHAR AND FRAGOSO 2022).

Pacientes com hipercortisolismo subclínico são diagnosticados através da presença de um conjunto de comorbidades como hipertensão, diabetes tipo 2 e dislipidemia, além dos desfechos clinicamente relevantes, principalmente fraturas vertebrais osteoporóticas e doenças cardiovasculares. Transtornos psiquiátricos são relatados, interferindo diretamente na qualidade de vida e desempenho do indivíduo. Estes achados, refletem o papel central do cortisol na homeostase do corpo (BUNEVICIUS *et al.* 2019).

Figura 1: A -Características físicas SD antes do tratamento; B - Pós-tratamento



Fonte (NIES *et al.* 2002)

Em 2008, diretrizes para a avaliação clínica de pacientes com suspeita de Cushing foram publicadas (Tabela 1), consenso aceito pela Endocrine Society Clinical – EUA (NIEMAN *et al.* 2008). Essas diretrizes destacam as características clínicas frequentemente observadas e investigadas durante consultas médicas. As orientações estabelecem um consenso sobre a avaliação clínica, mas não abrangem testes laboratoriais. A recomendação para exames de laboratório é dada após a classificação inicial dos pacientes. Este enfoque pode fazer com que indivíduos com alterações subclínicas de cortisol permaneçam não detectados, correndo o risco de serem diagnosticados apenas na eventualidade do surgimento de comorbidades aparentes de forma isolada.

Tabela 1: Condições sobrepostas e características clínicas da síndrome de Cushing Adaptado

Sintomas	Condições Sobrepostas
Características que melhor discriminam a síndrome de Cushing; a maioria não tem alta sensibilidade	Hipertensão ^{a,b}
Fácil formação de hematomas	Massa adrenal incidental
Mialgia proximal (ou fraqueza muscular proximal)	Osteoporose vertebral ^{a,b}
Obesidade	Síndrome do ovário policístico
Plethora facial	Diabetes tipo 2 ^{a,b}
Estrias (especialmente se roxas avermelhadas e com mais de 1 cm de largura)	Hipocalemia
Gordura dorsal-cervical (giba de búfalo)	Pedras nos rins
Plenitude facial	Infecções incomuns
Plenitude supraclavicular	
Pele fina ^{a,b}	
Edema periférico	
Acne	
Hirsutismo ou calvície feminina	
Cicatrização pobre da pele	
Em crianças, ganho de peso com diminuição da velocidade de crescimento	
Características da síndrome de Cushing na população geral que são comuns e/ou menos discriminatórias	
Depressão	
Fadiga	
Ganho de peso	
Dor nas costas	
Alterações no apetite	
Diminuição da concentração	
Diminuição da libido	
Memória prejudicada (especialmente memória de curto prazo)	
Insônia	
Irritabilidade	
Anormalidades menstruais	
Em crianças, crescimento lento	
Em crianças, virilização genital anormal	
Em crianças, baixa estatura	
Em crianças, puberdade precoce ou atrasada	

Fonte (NIEMAN *et al.* 2008)

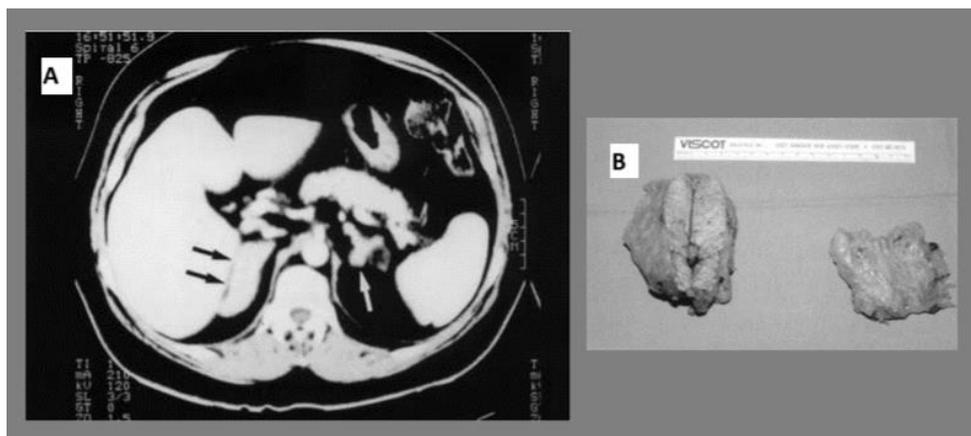
O comprometimento cardiometabólico nesses pacientes é frequentemente associado ao aumento da taxa de complicações infecciosas graves e da incidência de fraturas osteoporóticas além de distúrbios psiquiátricos, ficando claro o grande impacto psicossocial e potencialmente fatal que engloba os pacientes com síndrome de Cushing (HACIOGLU *et al.* 2024). O diagnóstico causal preciso, seguido de uma estratégia terapêutica e iniciada de forma precoce é capaz de trazer uma melhora significativa e, por vezes, o não surgimento de comorbidades graves ao paciente

2.1.2. Hiperplasia Adrenal Macronodular Bilateral Primária (PBMAH)

A PBMAH foi descrita pela primeira vez em 1964, como uma forma incomum de hiperplasia adrenal multinodular bilateral (KIRSCHNER *et al.* 1964). Esta hiperplasia macronodular é uma causa adrenal da Síndrome de Cushing, sendo uma doença altamente heterogênea. Sua principal característica são a presença dos macronódulos benignos bilaterais – com diâmetro acima de 1 cm – capazes de secretar cortisol em níveis variáveis de forma autônoma independentemente do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) da hipófise (BOUYS *et al.* 2021).

Historicamente, a PBMAH só é diagnosticada após investigações clínicas de excesso de cortisol em pacientes com suspeita de síndrome de Cushing de origem adrenal. Recentemente, o diagnóstico de PBMAH tem sido visto com mais frequência de forma incidental em pacientes com o que chamamos de Incidentalomas Adrenais (IAs) (Figura 2 A) Estima-se que cerca de 15% dos IAs são bilaterais e uma proporção considerável destes são PBMAH (Figura 2 B). Até o presente momento, não há estudos que tragam a frequência populacional precisa desta doença em incidentalomas bilaterais, mas acredita-se que estes representam mais de 10% de todos os incidentalomas e pode ser superior a 50% no subgrupo de pacientes que possuem secreção autônoma de cortisol (CAVALCANTE *et al.* 2022).

Figura 2: A - Incidentalomas Bilaterais; B:- Glândulas pós remoção cirúrgica contendo em seu interior diversos macronódulos



Fonte (NIES *et al.* 2002).

De forma isolada, os macronódulos são a única forma de manifestação clínica da PBMAH que possui um padrão de herança familiar ou de origem esporádica. A característica

bilateral dos nódulos adrenais e a identificação de casos familiares nos apontam fortemente para uma predisposição genética (CAVALCANTE *et al.* 2022).

Nos casos esporádicos, a PBMAH pode estar ligada à expressão atípica de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), que ao serem ativados por seus ligantes específicos provocam uma ativação anormal da síntese do cortisol. Uma grande parcela destes receptores atípicos estimula a via cAMP/PKA, bem como o ACTH nas glândulas suprarrenais normais (HE *et al.* 2021).

Mutações heterozigóticas inativadoras de linhagem germinativa no gene *ARMC5* - localizado no cromossomo 16 (chr 16p11.2) – associadas a PBMAH familiar foram descritas pela primeira vez em 2013 (ASSIE *et al.* 2013). Através de um estudo que sequenciou um material de linhagem somática proveniente do tecido tumoral de pacientes com variantes germinativas potencialmente patogênicas no gene *ARMC5*, foi possível comprovar a existência de uma segunda alteração genética presente no mesmo gene, resultando na inativação bialélica da transcrição do gene, caracterizando a doença em concordância com a hipótese dos dois fatores de Knudson (DAMJANOVIC *et al.* 2020).

Segundo estudos atuais, acredita-se que alterações no gene *ARMC5* estão presentes em cerca de 80% dos pacientes com PBMAH familiar, podemos verificar estas variantes em 55% dos que passam por cirurgia devido ao hipercortisolismo grave, além de aproximadamente 20-25% em todos os casos de PBMAH de forma geral, inclusive àqueles que parecem esporádicos (BOUYS *et al.* 2021).

No momento do diagnóstico da PBMAH os pacientes possuem entre 40 e 70 anos de idade e a prevalência é ligeiramente maior em mulheres do que em homens. Os aspectos clínicos apresentados dependem dos níveis de excesso de cortisol e variam desde PBMAH assintomático onde o diagnóstico é realizado em pacientes com incidentaloma adrenal bilateral sem sinais específicos de síndrome de Cushing, até pacientes com múltiplos sintomas clínicos devido à SC já manifestada. Os sinais específicos de excesso de cortisol, como a face com formato redondo (lua cheia), obesidade troncular, fraqueza muscular, estrias violáceas e hematomas, estão presentes em menos de 40% dos pacientes com PBMAH. Além disso, encontramos também algumas comorbidades inespecíficas, como diabetes mellitus (30–40%), hipertensão (65–85%) e osteoporose (15–20%) (CAVALCANTE *et al.* 2022).

A prevalência da PBMAH é baixa por ser uma doença subdiagnosticada, porém, possui importância clínica significativa devido às suas peculiaridades patológicas e de diagnóstico difícil. Além disso, sua definição se mantém controversa, contudo, a maioria dos autores

possui como concordância que o diagnóstico de PBMAH deve ser baseado na presença de possível secreção autônoma de cortisol (SCA) ou SCA devido à hiperplasia adrenal bilateral associada à presença de um ou mais IAs maiores que 1 cm em cada glândula adrenal (ARAUJO-CASTRO AND MARAZUELA 2022).

Um fato interessante a respeito dos IAs é que de 3–5% da população em geral pode abrigá-los e 9-15% destes são bilaterais. Os IAs bilaterais podem estar associados a possíveis SCA em até 40% dos casos. Por estes motivos, a prevalência real de PBMAH é maior do que a relatada em séries de pacientes com Síndrome de Cushing. Contudo, existem poucos dados sobre aspectos clínicos, hormonais e radiológicos desta doença que podem diferir daquelas apresentadas por outras lesões adrenais que não atendem aos critérios PBMAH e por este motivo, alguns autores vêm desenvolvendo estudos para propor uma unificação da classificação atual deste distúrbio, bem como seus achados (BENGOA-ROJANO *et al.* 2022).

Atualmente existe uma crescente preocupação sobre pacientes diagnosticados com IAs sem causa esclarecida que são submetidos à adrenalectomia por distúrbios adrenais benignos. Questões como insuficiência cardíaca e respiratória, devem ser consideradas dado o risco de aumento da taxa de complicações pós-operatórias além dos altos custos de hospitalização e impacto na vida destes pacientes (SUNG *et al.* 2022).

A prevalência de PBMAH familiar pode estar subestimada e a patogênese da doença ainda não foi totalmente elucidada. Embora pareça simples, o mecanismo por trás dessa condição é complexo. Para estes tipos de hiperplasia, a classificação adequada das doenças ainda precisa ser estabelecida, um melhor entendimento do seu mecanismo molecular pode auxiliar nas decisões terapêuticas e orientar novas alternativas médicas.

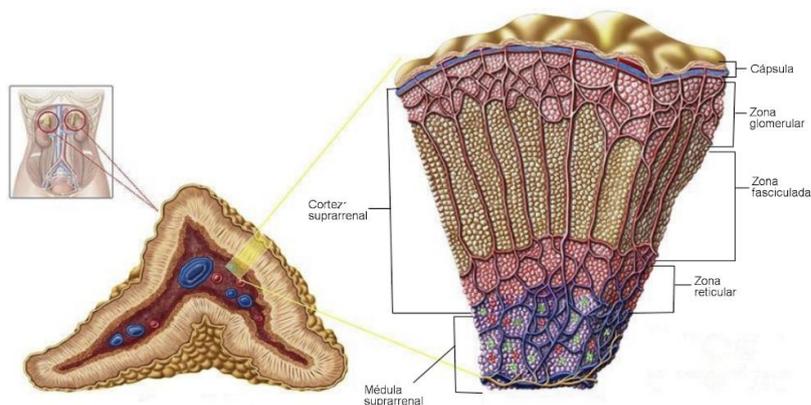
2.2 Fisiopatologia e Implicações Clínicas da PBMAH

2.2.1. Glândulas Adrenais

As glândulas suprarrenais, também conhecidas como adrenais, são duas pequenas glândulas endócrinas localizadas crânio-medialmente aos rins, medindo aproximadamente 5 cm. O córtex adrenal (Figura 3), derivado do tecido mesodérmico é composto por três zonas denominadas: Zona Glomerular, Zona Fasciculada e Zona Reticular, cada uma delas possui função na regulação fisiológica, além de sintetizarem esteróides vitais chamados de Glicocorticoides.

Os Glucocorticóides estão sob o controle do ACTH que, além de ser necessário para a esteroidogênese também é crucial para a diferenciação e crescimento do córtex adrenal (BORNSTEIN *et al.* 2008).

Figura 3: Glândula Adrenal e suas zonas ampliadas.



Fonte: <https://www.sanarmed.com/resumo-sobre-glandulas-adrenais-anatomia-histologia-hormonios-e-doencas>.

Os hormônios sintetizados pelas suprarrenais são cruciais para a regulação da resposta adaptativa do corpo ao estresse, para o equilíbrio hídrico e eletrolítico do organismo e para o controle da pressão arterial. A integridade da zona do córtex adrenal é interrompida em vários distúrbios adrenais, levando à deficiência ou ao excesso de cortisol.

2.2.2 Mecanismos Fisiopatológicos

Na PBMAH, os macronódulos adrenais funcionam independentemente do controle hipofisário, levando a uma produção desregulada de cortisol. Esta autonomia é frequentemente associada a alterações genéticas nos nódulos, que podem afetar receptores ou vias de sinalização celular. Os tumores adrenais benignos cobrem um espectro de lesões com morfologia distinta e secreção de esteróides.

A classificação atual é empírica, além de algumas mutações condutoras, a fisiopatologia está em constante estudo para um melhor entendimento (STRATAKIS AND BOIKOS 2007).

2.2.3 Lesões Adrenocorticais

Tumores e Hiperplasias adrenocorticais são lesões tipicamente benignas que reúnem um vasto espectro de doenças, dentre elas a PBMAH. Estes tumores podem secretar tanto

cortisol quanto aldosterona, onde os produtores de cortisol são os responsáveis pelo hipercortisolismo com síndrome de Cushing evidente, e o subclínico que atualmente tem sido referido como excesso leve de cortisol autônomo (STRATAKIS 2008).

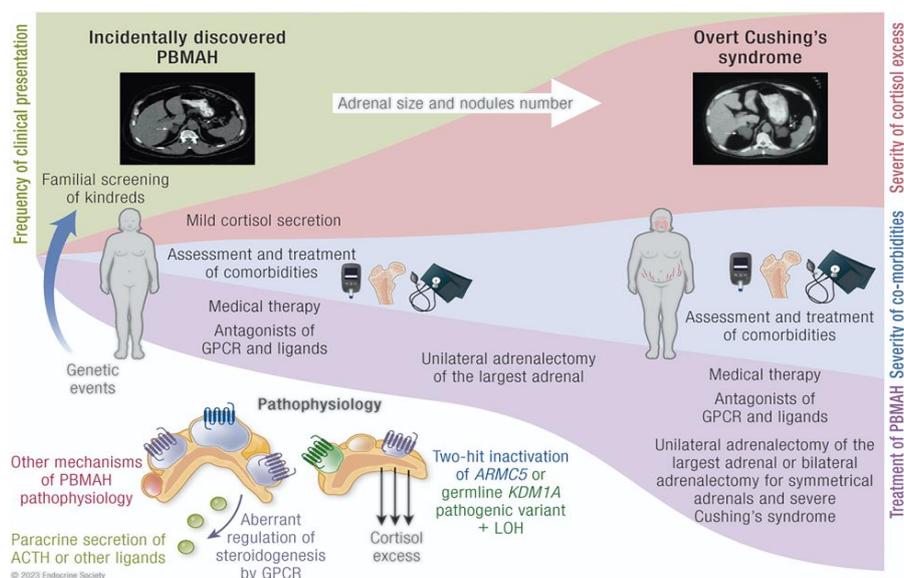
Nem todos os tumores necessariamente secretam os esteroides citados, porém na maioria das vezes são capazes de produzir pequenas quantidades de precursores destes que são detectáveis apenas através de exames específicos como por exemplo a espectrofotometria de massa que não é realizada comumente.

Quando os níveis dos esteróides não são detectáveis nos exames convencionais, os tumores são chamados de “não funcionais”. Tanto tumores não funcionais, quanto os que alteram de forma discreta os níveis de cortisol representam até 5% de prevalência, frequentemente vistos de forma incidental em exames de imagem, principalmente Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética. As características macroscópicas das glândulas adrenais na PBMAH são muito parecidas com o observado nos Adenomas Adrenais: ricos em gordura, tamanho aumentado, nódulos amarelados e não pigmentados maiores que 1cm de diâmetro (FAILLOT *et al.* 2021).

2.2.4 Incidentalomas adrenais

Incidentaloma Adrenal (IA) refere-se a uma massa adrenal assintomática identificada em exames de imagem que são solicitados por motivos diversos e geralmente não são devido a suspeita de doença adrenal (Figura 4).

Figura 4 Resumo gráfico descoberta da PBMAH através dos incidentalomas



Fonte (BERTHERAT *et al.* 2023).

De acordo com uma pesquisa recente sobre incidentalomas adrenais, observou-se que o IA é um diagnóstico endócrino comum, podendo ser encontrado em aproximadamente 2% da população geral. A ocorrência de IA em indivíduos com menos de 40 anos é considerada rara, no entanto, sua prevalência aumenta significativamente com a idade, afetando mais de 7% das pessoas acima de 70 anos. Dos casos de IAs cerca de 2% dos pacientes pode desenvolver câncer adrenocortical (SHERLOCK *et al.* 2020).

Relatórios do National Institutes of Health (NIH) sugerem que até 20% dos pacientes com incidentaloma adrenal apresentam alguma forma de disfunção hormonal subclínica e podem representar uma população com maior risco de distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares (GRUMBACH *et al.* 2003).

As causas dos IAs são diversas e tem grande variabilidade, englobando desde lesões benignas ou malignas que podem ser originárias do córtex ou da medula adrenal, bem como, de origens extra-adrenais. Esses IAs frequentemente são adenomas adrenocorticais benignos e não funcionais, porém é possível que haja a necessidade de tratamento para alguns casos, como por exemplo para: feocromocitoma, adenomas produtores de hormônio, carcinoma adrenocortical ou metástase (LOMTE *et al.* 2016).

Devido ao aumento nos relatos de casos de pacientes portadores de IAs, a investigação do hipercortisolismo subclínico tem despertado interesse crescente podendo chegar a 30% dos achados esporádicos em exames de imagem nos chamando atenção pois, afetam uma porção significativa de pessoas (FAILLOT *et al.* 2021).

Em artigo recente da sociedade europeia de endocrinologia foram introduzidas as diretrizes interdisciplinares internacionais atualizadas sobre os IAs. Além de recomendações específicas para o acompanhamento e manejo de pacientes com incidentalomas bilaterais (FASSNACHT *et al.* 2023).

2.3 Aspectos Moleculares da PBMAH

2.3.1 Via cAMP/PKA

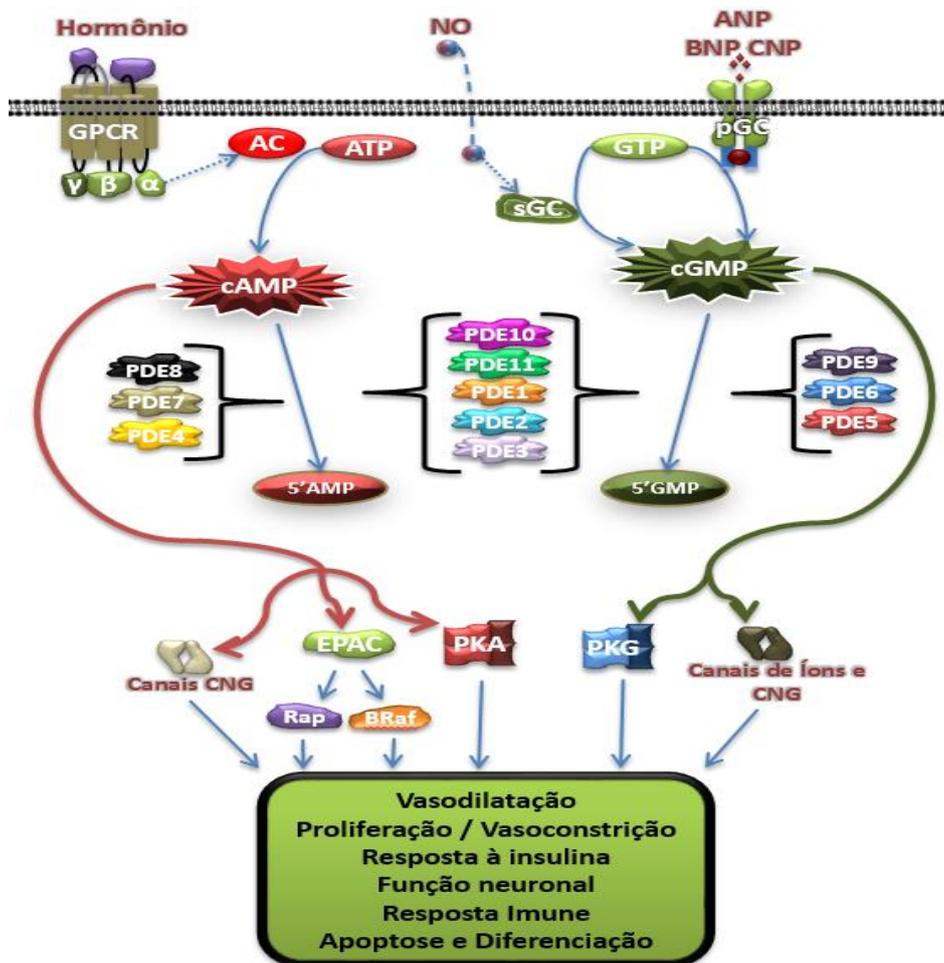
A via cAMP/PKA tem sido objeto de intensa investigação no campo da genética em relação a distúrbios adrenais, e tem aberto caminho para o entendimento sobre os mecanismos moleculares subjacentes à tumorigênese adrenocortical benigna. Nos tecidos endócrinos, o AMP cíclico (cAMP) possui uma função crucial na regulação do metabolismo celular, crescimento, diferenciação e apoptose (ARAUJO-CASTRO AND MARAZUELA 2022).

A adenosina 3',5'-monofosfato cíclico - AMPc ou cAMP - atua como um segundo mensageiro intracelular universal se ligando às subunidades reguladoras da PKA (PRKAR)

desencadeando uma alteração conformacional reversível. Como resultado deste processo, temos a liberação das subunidades catalíticas (PRKAC), que são essenciais para a fosforilação de uma variedade de proteínas, desempenhando um papel chave na transmissão de sinalização intracelular (BEUSCHLEIN *et al.* 2014).

A proteína quinase A (PKA) como efetor primário desta via, é responsável pela fosforilação de substratos, incluindo alvos tanto no citosol quanto no núcleo, com ênfase particular nos fatores de transcrição da família CREB/ATF2. A ativação via cAMP (Figura 5) é fundamental para promover a ampliação da função e replicação celular em diversos tipos de células endócrinas, incluindo as adrenocorticais. A PKA desempenha um papel essencial na facilitação das ações de hormônios, neurotransmissores e outras moléculas de sinalização que interagem com os receptores acoplados à proteína G (GPCRs), influenciando assim os níveis intracelulares de cAMP (BOUYS *et al.* 2021).

Figura 5: Ativação da via cAMP.



Fonte: Autor

Nas condições fisiológicas, as células adrenocorticais são predominantemente reguladas pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), que exerce sua função através da interação com o receptor de melanocortina 2 (MC2R), um receptor acoplado à proteína G (GPCR) amplamente expresso na superfície dessas células.

Colaborando com estes dados, uma série de estudos *in vitro* com modelos animais e análises de distúrbios genéticos humanos sublinham a importância da via cAMP/PKA na patogênese da hiperplasia adrenal e do hipercortisolismo (BEUSCHLEIN *et al.* 2014).

2.3.2 Aspectos Genéticos da PBMAH

A genética da PBMAH é complexa e envolve tanto alterações somáticas quanto germinativas explicada pela hipótese de dois fatores. Alguns autores já relataram variantes relacionadas a tipos raros de tumores produtores de cortisol em genes como *TP53* e *CTNNB1* (ASSIE *et al.* 2014). Em estudos moleculares envolvendo pacientes com adenomas adrenais foram observadas alterações no cromossomo 9, incluindo o gene *NR5A1*, fundamental para a diferenciação esteroidogênica (SHERLOCK *et al.* 2020).

Quando apresentada de forma síndrômica a PBMAH pode possuir características clínicas de doenças que ocorrem por alterações em genes supressores de tumor como o *MEN1*, *APC* e *FH*. Nestes contextos é possível observar a PBMAH associada ao câncer de células renais, cujas principais manifestações são leiomiomas, leiomiiossarcomas e câncer renal, com massas adrenais presentes em menos de 8% dos casos e apenas 15% deles apresentando envolvimento bilateral (BOUYS *et al.* 2021).

O gene *ARMC5* tem sido fortemente associado a casos familiares da PBMAH. Alterações neste gene podem estar presentes em cerca de 80% dos indivíduos estudados. Em um estudo onde houve avaliação genética de pacientes e de seus tumores, foi observado o acontecimento de dois eventos no gene *ARMC5*, um primeiro germinativo e um segundo na linhagem somática, resultando na inativação bialélica do gene, corroborando com a teoria de dois fatores de Knudson. Este gene, ainda não possui sua função totalmente esclarecida, mas suspeita-se que faz possui um papel importante na via cAMP/PKA (ASSIE *et al.* 2013).

Variantes germinativas do gene *PDE11A*, que codifica uma fosfodiesterase e atua como regulador negativo da via cAMP/PKA, foram observadas com maior frequência nos pacientes em comparação à população em geral. Algumas dessas variantes mostraram *in vitro* uma diminuição da atividade enzimática (TATSI *et al.* 2020). Devido à esta observação, levanta-se a suspeita de que a hiperatividade da via cAMP/PKA possivelmente

desempenhe um papel fundamental em muitos casos de tumores adrenais, inclusive na PBMAH.

Um método eficaz para orientar a investigação e a filtragem genética da PBMAH envolve a análise dos mecanismos genéticos presentes na SC, assim como nos tumores adrenocorticais e hipofisários. Estas condições compartilham vias de sinalização e mecanismos patológicos similares. Por exemplo, o Complexo de Carney, que pode resultar de mutações nos genes *PRKAR1A* – responsável pela codificação da subunidade reguladora alfa tipo 1 da proteína quinase A - ou *PRKACB* - que codifica a subunidade catalítica beta da mesma proteína. Ambos os genes são integrantes da via cAMP, a qual desempenha um papel regulatório crucial nas células endócrinas (CHANG *et al.* 2020).

Estudos recentes têm explorado também alteração da expressão de miRNAs (MicroRNAs) circulantes como biomarcadores potenciais em várias condições. Os miRNAs são moléculas de RNA pequenas e não codificantes contendo em média cerca de 16 a 24 nucleotídeos, fundamentais na regulação pós-transcricional da expressão gênica, podendo influenciar mais de 50% dos genes codificadores de proteínas nos seres humanos (O'BRIEN *et al.* 2018). Estes RNAs podem ser de origem intergênica com o seu próprio loci pre-miRNAs de cerca de 60 a 90 nucleotídeos no qual será responsável pela formação dos *hairpins*, assim como também podem se originar de regiões intrônicas ou regiões das extremidades não codificantes (UTRs) de genes (MARCINKOWSKA *et al.* 2011; HACKL *et al.* 2012; JUANCHICH *et al.* 2016).

Um estudo específico comparou a expressão de miRNA em pacientes com PBMAH com aqueles com adenomas adrenocorticais não funcionantes (NFA) e produtores de cortisol (CPA), revelando diferenças significativas entre os fenótipos de PBMAH e adenoma. Três miRNAs circulantes foram capazes de diferenciar PBMAH de adenomas (HARA *et al.* 2022). Futuramente, o perfil de miRNA circulante pode auxiliar na identificação de subtipos de PBMAH, influenciando a escolha de abordagens cirúrgicas adrenais. Além disso, extensas análises com foco nesses alvos potenciais poderiam ajudar na elucidação de vias epigenéticas específicas que tem interferência direta na patologia da SC e seus diferentes subtipos (VETRIVEL *et al.* 2022).

A avaliação genética através de WGS poderia auxiliar no diagnóstico da PBMAH e fornecer informações cruciais para o manejo terapêutico, além de direcionar abordagens como o aconselhamento genético em pacientes e familiares portadores de variantes.

2.4 WGS, Processamento e Análise de Dados

2.4.1 Sequenciamento do Genoma Completo – WGS

O WGS é uma estratégia que oferece vantagens potenciais em relação às abordagens clássicas nas quais os genes são analisados individualmente, muitas vezes durante um longo período e com custos altos (MARSHALL *et al.* 2020). Uma das principais vantagens do WGS é sua capacidade de analisar simultaneamente uma ampla gama de alterações genéticas, incluindo variantes estruturais (SVs), alterações no número de cópias (CNVs) e outros tipos de eventos não detectáveis pelos outros métodos de sequenciamento ou técnicas complementares como citogenética e CGH-Array. Esta abordagem também supera outras limitações técnicas de outros métodos de NGS baseados em enriquecimento, promovendo uma cobertura uniforme, cobertura em toda extensão do gene incluindo as regiões exônicas, intrônicas e intergênicas, menores chances de achados falso positivos e falsos negativos, confirmação de paternidade, assim como também um aumento de sensibilidade para a detecção de alterações complexas. (AUSTIN-TSE *et al.* 2022).

Com a crescente produção de dados de NGS surgiram também questões quanto a padronização de métricas para que estes sejam confiáveis. A estimativa de profundidade e cobertura corretas são um ponto de partida recomendado ao avaliar os limiares em torno de um ensaio NGS específico levando em consideração erros de sequenciamento, bem como erros específicos do ensaio. Para cobertura a recomendação da Illumina para WGS humano com finalidade de sequenciamento de variantes relacionadas ao risco hereditário é de 30x a 50x (dependendo da aplicação e do modelo estatístico). Já para a avaliação de profundidade é importante considerar fatores específicos do ensaio e a finalidade do estudo, já que diferentes tipos de eventos possuem sensibilidades diferentes de acordo com a profundidade. Não somente a cobertura influencia na sensibilidade de detecção de variantes, mas também a qualidade da amostra, qualidade dos reagentes, método de preparo da biblioteca, qualidade e contaminação do ambiente (PETRACKOVA *et al.* 2019).

2.4.2 Processamento e Análise dos Resultados

À medida que o WGS foi amadurecendo e sendo cada vez mais utilizado, ganhamos uma melhor compreensão de suas capacidades para o diagnóstico de doenças. O potencial de identificação dos diferentes tipos de variantes detectáveis por WGS depende diretamente de quais ferramentas de chamada de variantes foram utilizados e da qualidade e conhecimento de quem construiu o pipeline não existindo normas reguladoras de boas

práticas que abordem a definição e o desempenho de ferramentas de bioinformática (YANG *et al.* 2023).

Dessa forma é importante que laboratórios de diagnóstico passem a utilizar apenas os pipelines recomendados e mais atualizados o possível de acordo com as boas práticas do GATK (<https://gatk.broadinstitute.org/>), e se possível, utilizar pipelines referência aprovados no desafio da FDA no PrecisionFDA Truth Challenge V2 (OLSON *et al.* 2022) como a ferramenta DRAGEN da Illumina.

Adicionalmente, não basta ter uma boa análise primária e secundária, é importante ter uma grande quantidade de bancos de dados atualizados, cruzamento e normalização das anotações, pipelines rápidos e eficientes, além de facilidade na filtragem das variantes permitindo análise terciária mais sensível e com maior capacidade de diagnóstico. Ressaltando a importância do uso de ferramentas consolidadas como a EmedGene.

Além disso, os responsáveis pela análise e detecção de variantes também devem conhecer as regras publicadas pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG)(RICHARDS *et al.* 2015) e posteriormente dada continuação pela ClinGen (<https://clinicalgenome.org/docs/variant-curation-standard-operating-procedure-version-3/>).

As normas da ACMG/ClinGen foram desenvolvidas para dar orientações na curadoria e interpretação de variantes, e suas diretrizes têm sido revisado continuamente, visando orientar profissionais e padronizar os critérios de interpretação. Além disso, a ACMG possui recomendações para testes genéticos e suas aplicações. Além disso, os responsáveis pela análise e detecção de variantes também devem conhecer as regras publicadas pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG)(RICHARDS *et al.* 2015) e posteriormente dada continuação pela ClinGen (<https://clinicalgenome.org/docs/variant-curation-standard-operating-procedure-version-3/>). com técnicas de anotação e análise atualizadas. A orientação mais recente sobre a seleção de metodologias para análises familiares informa que o sequenciamento de Genoma ou Exoma deve ser considerado na avaliação diagnóstica clínica de um indivíduo fenotipicamente afetado quando:

- a. Os dados do fenótipo ou da história familiar implicam fortemente uma etiologia genética, mas o fenótipo não corresponde a uma doença específica para a qual um teste genético direcionado a um gene específico esteja disponível numa base clínica;
- b. Um paciente apresenta um distúrbio genético definido que demonstra um alto grau de heterogeneidade genética, tornando a análise WES ou WGS de múltiplos genes simultaneamente uma abordagem mais prática;

c. Um paciente apresenta um provável distúrbio genético, mas os testes genéticos específicos disponíveis para esse fenótipo não conseguiram chegar a um diagnóstico;

d. Um feto com uma provável doença genética em que testes genéticos específicos, incluindo testes de sequenciação direcionados, disponíveis para esse fenótipo não conseguiram chegar a um diagnóstico.

Tais diretrizes são um recurso educacional para auxílio a profissionais e laboratórios com o intuito ajudá-los a fornecer informações seguras e de qualidade às equipes de saúde e pacientes (DIRECTORS 2012).

A explicação sobre o heredograma está descrita na Tabela 2. A amostra da paciente 4 (caso índice) já estava esgotada no momento deste estudo, portanto não foi sequenciada.

Tabela 2 Heredograma – descrição da correlação entre parentesco e membros afetados

Amostra	Idade na data da coleta	Idade ao diagnóstico	Sequenciado	Parentesco	Sexo Biológico
2	51	-	Sim	Primo	Masculino
4	54	50	Não	Prima	Feminino
5	45	-	Sim	Primo	Masculino
9	53	-	Sim	Prima	Feminino
10	35	-	Sim	Prima de segundo grau	Feminino
13	31	-	Sim	Prima de segundo grau	Feminino
15	26	-	Sim	Primo de segundo grau	Masculino
19	32	-	Sim	Prima de segundo grau	Feminino
20	29	-	Sim	Prima de segundo grau	Feminino
22	8	-	Sim	Prima de segundo grau	Feminino
28	57	38	Sim	Paciente	Feminino

Fonte: Autora

O DNA das amostras de sangue periférico dos pacientes foi extraído manualmente pelo método de coluna com o kit comercial da Qiagen conforme protocolo oficial do fornecedor. O material extraído foi quantificado utilizando os equipamentos Nanodrop e Qubit, e os dados de quantificação das amostras podem ser consultados na aba “Quantificações” no Anexo 1.

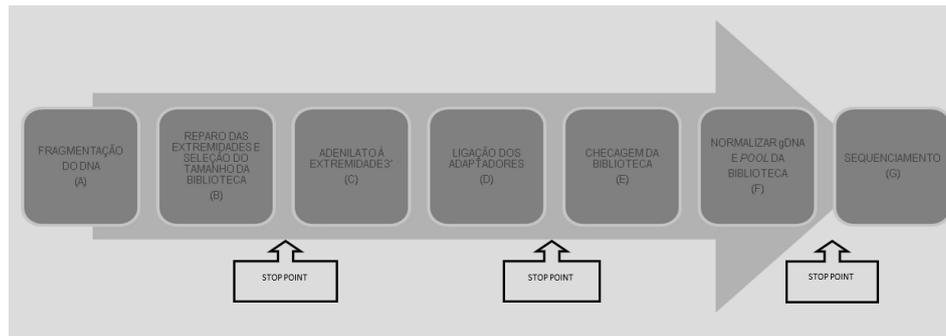
3.2 Repli-G

Devido à escassez do material, foi necessário amplificar o DNA utilizando a técnica Repli-G que consiste em amplificação isotérmica do material chamada de Multiple Displacement Amplification (MDA), envolvendo uma ligação de exômetros aleatórios ao DNA desnaturado. O protocolo foi seguido de acordo com as especificações do fornecedor.

3.3 Fragmentação do DNA genômico

Para que o DNA seja sequenciado dentro da metodologia WGS, utilizando a plataforma Illumina, o material genético precisa ser previamente preparado através de uma série de etapas. A Figura 7 demonstra de forma resumida o protocolo utilizado com o kit Illumina® TruSeq® DNA PCR-Free e preparado de acordo com as especificações do fornecedor.

Figura 7 Fluxo de trabalho do preparo de biblioteca Illumina® TruSeq® DNA PCR-Free.



Fonte Illumina® TruSeq® DNA PCR-Free.

O DNA proveniente da etapa de Repli-G foi fragmentado pelo método mecânico utilizando o ultrassonicador Covaris que funciona através da transmissão de energia acústica em frequências ultrassônicas (>400KHz) e comprimentos de onda muito curtos (~3mm), sendo exclusivamente capaz de cortar o DNA de forma homogênea em cerca de 350pb.

3.4 Reparo das extremidades, adenilação e seleção do tamanho da biblioteca

Após a fragmentação são utilizados reagentes para a reparação e adenilação das extremidades. O material desta fase é purificado para remoção dos fragmentos de tamanho inespecífico e outros vestígios de reagentes das etapas anteriores.

3.5 Ligação do DNA aos adaptadores e purificação

Neste passo ocorre a ligação dos adaptadores do duplo índice às extremidades do fragmento de DNA seguida de uma purificação, preparando os fragmentos para hibridização na flow cell. Os índices são pequenas sequências únicas de DNA que deverão ser atribuídos individualmente para cada preparo de biblioteca, permitindo a diferenciação dos fragmentos de DNA oriundos de cada amostra.

3.6 Checagem e controle de qualidade da biblioteca

Com a biblioteca purificada é realizada uma qualificação e verificação dos tamanhos de fragmentos em um equipamento de eletroforese digital como o Tapestation ou similar. O fragmento médio observado deve estar em torno de 470pb.

A etapa seguinte consiste na quantificação por Qubit DNA High sensitivity e normalização da quantidade de DNA de cada preparo de maneira precisa para que a formação do *pool*. Após o *pooling* é realizada a conversão da quantidade em ng para nM utilizando a fórmula descrita abaixo:

$$Mol = \frac{C_1}{T_{mpb} * 660} 10^6$$

Concentração em Molar = C_1 [Concentração em ng/μl do pool] / (660 g/mol x T_{mpb} [Tamanho médio da biblioteca em pb]) x 10^6

Após a formação do pool de bibliotecas, foram realizadas diluições seriadas para a concentração e volume desejável para carregamento no equipamento. Ao final da desnaturação, as amostras estão prontas para serem carregadas no cartucho de sequenciamento de acordo com o procedimento recomendado no manual do fabricante Illumina.

3.7 Sequenciamento no Sistema NovaSeq 6000

Os fragmentos indexados com adaptadores e normalizados foram carregados em um NovaSeq 6000 resultando em um conjunto de leituras curtas conhecidas como reads. Ao final do processo de sequenciamento o equipamento demultiplexa as amostras de acordo com as sequências dos indexes e gera arquivos individuais por preparo de biblioteca.

3.8 Processamento de dados e análise de bioinformática

Os dados demultiplexados foram processados e analisados na plataforma Emedgene . Os arquivos do tipo fastq foram alinhados contra o genoma de referência GRCh37(hg19) utilizando o pipeline da Illumina Dragen 3.6.3. As versões de softwares e/ou bancos de dados utilizados pela plataforma de análise terciária foram as descritas na Tabela 3:

Tabela 3: Versões Emedgene

Annotation	Organization Local Databases	Knowledgebase Sources	Input Data
DANN:	Manually curated variants:	CGD:	ADT45_02.dragen.cnv.vcf.gz
Nov 14 2014	##fileDate=2023-12-20	04/05/2023	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
GERP:	Population Databases	ClinGen_Ht:	ADT45_05.dragen.cnv.vcf.gz
May 22 2011	DECIPHER:	16/11/2023	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
REVEL:	9.30 (Overlapping: input = 70%, db = 70%)	DECIPHER_Ht:	ADT45_09.dragen.cnv.vcf.gz
30_03_2022	DGV:	3	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
SnEFF:	2016-05-15 (Overlapping: input = 70%, db = 70%)	EMEDGENE:	ADT45_10.dragen.cnv.vcf.gz
4.3T	ExAC:	16/11/2023	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
SpliceAt:	0.3.1	Gnomad_constraint:	ADT45_13.dragen.cnv.vcf.gz
1.2.1	GnomAD Exomes:	2.1	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
dbNSFP:	2.1.0	HGNC:	ADT45_15.dragen.cnv.vcf.gz
2.9.3	GnomAD Genomes:	16/11/2023	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
dbSNV:	2.1.0	HPO:	ADT45_19.dragen.cnv.vcf.gz
1.1	GnomAD STR:	16/11/2023	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
Emedgene Resources	20220425	OMIM:	ADT45_20.dragen.cnv.vcf.gz
ACMG Tags Model:	GnomAD SV:	16/11/2023	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
0.5.4	2.1 (Overlapping: input = 70%, db = 70%)	Orphanet:	ADT45_22.dragen.cnv.vcf.gz
Auto-Analysis Model:	Great Middle East:	2.8	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
9.2.12-src, tier V0	20210218	Uniprot:	ADT45_28.dragen.cnv.vcf.gz
Emedgene DB:	MITOMAP Polymorphisms:	08/11/2023	DragenCNV 3.6, DragenCNVEmedgenizer V1.0.2
3	20210526	Human genome reference version:	Dragen.hard-filtered.vcf.gz
Emedgene Knowledgebase:	Thousand Genomes:	GRCh37 (hs37d5)	Dragen 3.6.3, DragenEmedgenizer V1.0.0
zoidberg65	20150218_2	Reference:	
Emedgene pipeline:	Thousand Genomes SV:	GRCh37	
5.29.49	2016-05-15_v2 (Overlapping: input = 70%, db = 70%)		
Phenocompare Model:	ThousandGenomeSTRAnnotation:		
32.0.4	20220425		
Input data			

Fonte Software Emedgene

O processamento dos dados até a análise de variantes contempla as seguintes etapas:

a. Análise Primária:

Esta fase envolve o processamento dos dados brutos do sequenciamento, capturados pelo equipamento. A finalidade é produzir leituras de sequenciamento demultiplexados e sem adaptadores resultando no arquivo FASTQ e avaliar a qualidade dessas leituras com o arquivo FastQC considerando como métrica genérica de qualidade o Q30;

b. Análise Secundária

Essa etapa consiste no alinhamento das leituras com o genoma de referência, seguido pela chamada de variantes. O formato de entrada é o FASTQ e de saída os resultados arquivos BAM, SAM e VCFs para diferentes tipos de chamadas de variantes;

c. Análise Terciária

Foca na interpretação dos dados, buscando a relação entre as variantes genéticas e bancos de dados populacionais, clínicos e de predição de dano. Inicia-se com a anotação de variantes, que adiciona informações biológicas às variantes identificadas. Segue-se a filtragem, seleção e visualização de variantes, utilizando critérios como frequência populacional e impacto funcional previsto. Softwares comerciais auxiliam nessa interpretação, facilitando o uso por profissionais da área médica e da pesquisa.

3.9 Análise dos dados e variantes obtidos

Para esta etapa foi utilizado o software Emedgene – Illumina, ferramenta baseada em inteligência artificial (IA), para automação e interpretação de dados de sequenciamento utilizado tanto para uso clínico quanto para pesquisa científica.

Para determinação de cobertura e qualidade esperada para a análise de dados, foi seguido como padrão o documento de *best practices* de WGS para doenças germinativas de 2020 (MARSHALL *et al.* 2020). Juntamente com uma análise de parentesco entre as amostras, variantes de nucleotídeo único (SNVs), inserções/deleções (indels), variantes de número de cópias (CNVs), variantes de DNA mitocondrial (mtDNA), variantes estruturais (SVs) e repetições em tandem curtas (STRs) se baseando nas regras da ACMG/ClinGen (RICHARDS *et al.* 2015).

Além disso, para a filtragem de variantes, foi inserido também uma lista de doenças e genes (Anexo 1 abas: Genes e Sintomas - HPOs) relacionados as vias metabólicas investigadas e/ou correlacionadas com a clínica tanto para o diagnóstico diferencial e de fenótipos similares, através de uma curadoria manual de artigos atuais e revisões de literatura, bancos de dados como Human Phenotype Ontology (HPO - <https://hpo.jax.org/>), ClinGen Gene-Disease Validity (<https://clinicalgenome.org/>), Human Gene Mutation Database (HGMD - <https://www.hgmd.cf.ac.uk/>), KEGG PATHWAY Database, String (<https://string-db.org/>) e IntAct (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>).

4 RESULTADOS

A análise de dados do sequenciamento revelou a presença de pequenas deleções e duplicações falso-positivas (FP), especialmente nas regiões de repetição. Este fenômeno é comum quando se usa a técnica de amplificação Repli-g em amostras de DNA de baixa quantidade e qualidade. Tais achados são erros, frequentes em reações de PCR e ocorrem principalmente em regiões com cinco ou mais bases repetidas. Estas variantes apresentam uma carga mutacional geralmente inferior a 20%, significando que menos do que esta quantidade das leituras do sequenciamento exibem tais alterações, sendo um padrão observado em múltiplos indivíduos.

Devido à baixa cobertura de algumas regiões juntamente com a baixa qualidade e escassez do DNA dos pacientes, estes achados alterados chegaram a atingir frequências muito superiores. Por este motivo, foi possível diferenciar falsos positivos de verdadeiros positivos (VP) apenas com base em uma análise comparativa da seguinte forma:

1. comparação entre os indivíduos da mesma rotina;
2. frequência na população geral;
3. associação de fenótipo x genótipo.

A opção pelo uso da técnica de Repli-g na tentativa de aumentar a quantidade do DNA para o sequenciamento, não atingiu o objetivo esperado para que a cobertura desejada fosse atingida. Foi possível observar entre as amostras uma média de 12.6x de cobertura vertical, sendo a variação de 8.9x (ADT45_23) para a menor e 18.4x (ADT45_22) para a mais bem coberta (Tabela 4). Nota-se também que a amostra com menor cobertura média não foi necessariamente a com menor cobertura longitudinal. A amostra ADT45_13 possui apenas 8,4% do genoma coberto a 10x e 0,9% coberto a 20x, com um total de variantes de apenas 1.898.490. Adicionalmente, entre o total de 7.251.001 variantes compartilhadas, as regiões de 3.249.376 variantes não estavam cobertas neste paciente (Tabela 4).

Apesar de algumas amostras atingirem um padrão razoável de cobertura vertical (>15x), não houve uma mesma correspondência com as métricas horizontais. Nenhuma das amostras atingiu um valor próximo a métrica mínima estipulada para este dado ($\geq 90\%$ de 20x), onde a amostra de maior qualidade ficou com apenas 11.8% (ADT45_22) do material sequenciado com pelos menos 20 reads (Tabela 4). Métricas como fastQC, MultiQC, uniformidade e sumarização de tipo de variantes não foram disponibilizadas pela ferramenta.

Tabela 4: Média de cobertura

Amostra	Média de cobertura	%>10x	%>20x	Taxa de erro%	Variantes identificadas	Variantes sem cobertura*
ADT45_10	10,4	10	0,9	85,7	1.966.786	2.879.533
ADT45_13	14	8,4	0,9	89,8	1.898.490	3.249.376
ADT45_15	13,9	48,2	8,6	53,9	2.402.263	707.413
ADT45_02	13,1	54,6	11	50	2.412.394	576.693
ADT45_05	13	56,3	11,2	48,2	2.415.094	511.984
ADT45_19	15,2	50,1	9,4	55,4	2.399.902	687.806
ADT45_20	12,5	13,8	1,5	81,8	2.039.947	2.534.090
ADT45_22	18,4	50,2	11,8	49,1	2.396.591	743.317
ADT45_23	8,9	37,5	5,5	66,2	2.247.887	1.204.740
ADT45_09	9,4	15,1	1,2	82,5	2.113.615	2.149.091
ADT45_08	9,4	41,3	6,1	63,2	2.310.539	939.570
ADT45_28	13,3	49,5	9	50,2	2.378.151	659.025

Fonte Autora

Observando o BAM foi possível notar um exemplo de discrepância de cobertura, onde uma região de tamanho inferior a cinco mil bases possui uma cobertura entre 13 até 5200 reads, o que não é normal em um sequenciamento de genoma completo. Dada característica deste dado e a presença desta região em todas as amostras, não é possível identificar a origem de tais regiões tão enriquecidas (Figura 8).

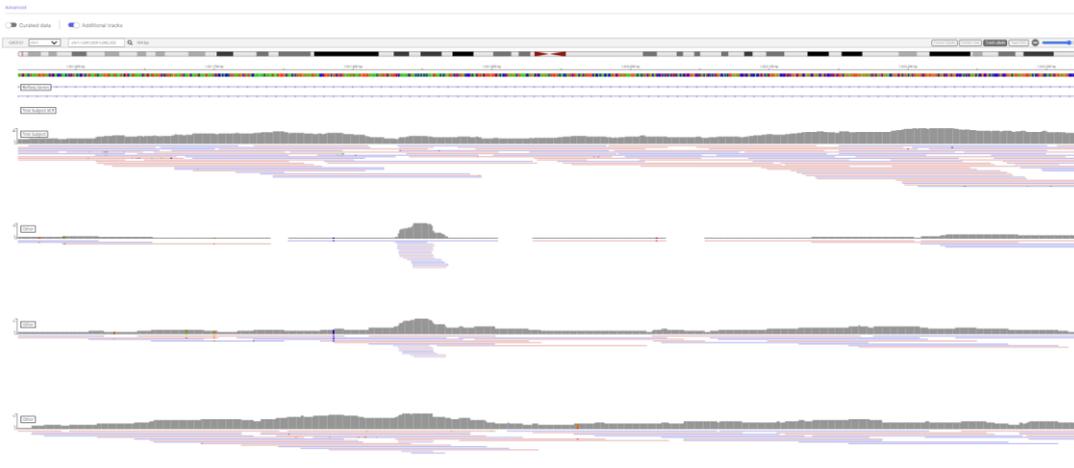
Figura 8: Visualização dos dados no IGV - discrepância de cobertura



Fonte – IGV (Autora)

Durante a visualização do dado no IGV, também foi possível identificar clusters de dímeros de primers presentes principalmente nas amostras mais escassas e fragmentadas (Figuras 9 e 10).

Figura 9: Visualização dos dados no IGV – Dímeros de Primers



Fonte – IGV (Autora)

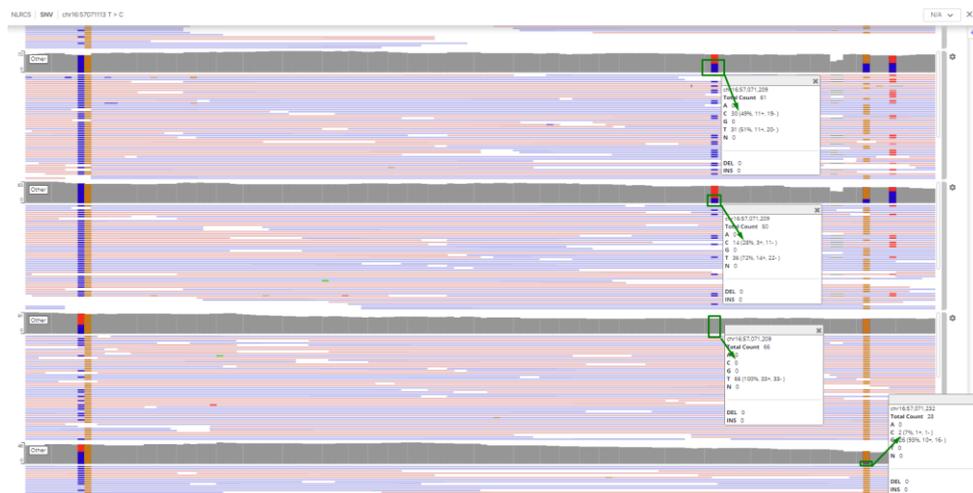
Figura 10: Visualização dos dados no IGV – Dímeros de Primers



Fonte – IGV (Autora)

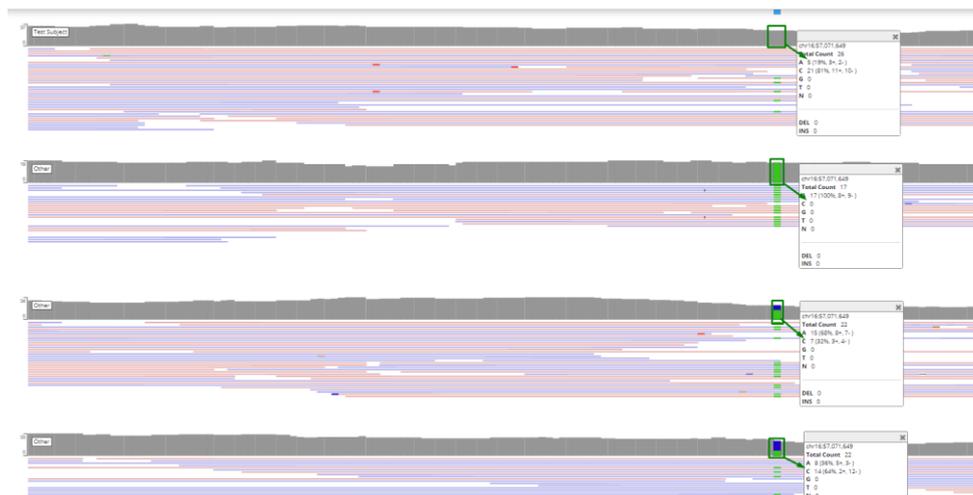
Por se tratar de amostras antigas que foram utilizadas para diversos experimentos anteriores, também foi feita uma análise manual para verificação de uma possível contaminação das amostras. Como é possível notar nas duas imagens de exemplo abaixo (Figuras 11 e 12), existe um padrão de contaminação intermitente entre diversas amostras e não somente atribuída a um único agente contaminante. Dado ao fato de que estas amostras foram manipuladas por diversos pesquisadores e estudantes no passado, pode-se levar em consideração que esta contaminação pode ter acontecido anteriormente a este estudo, durante o processamento, o armazenamento ou até mesmo devido à má higienização do ambiente, equipamentos e EPIs.

Figura 11: Visualização dos dados no IGV – Evidências de contaminação das amostras



Fonte – IGV (Autora)

Figura 12: Visualização dos dados no IGV – Evidências de contaminação das amostras

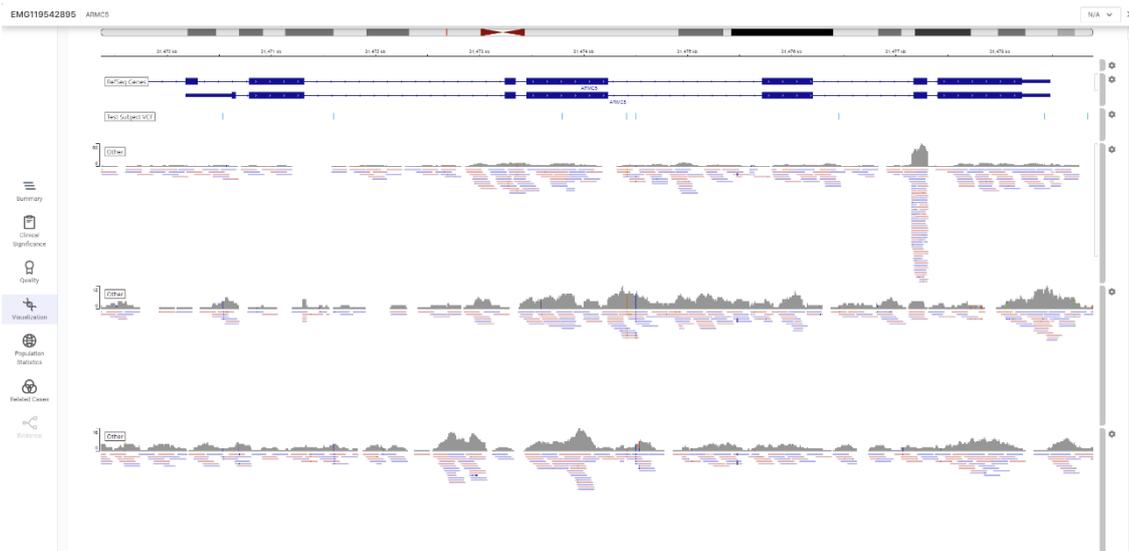


Fonte – IGV (Autora)

Devido à baixa cobertura de sequenciamento e a alta complexidade da contaminação identificada não foi possível mensurar quantas amostras estavam de fato contaminadas e a taxa de contaminação entre elas.

Em relação as métricas genes específicos, pelo fato da plataforma Emedgene não ter aprovado as amostras nas métricas de qualidade e pedigree, não gerou métricas de cobertura para os genes. Dessa forma, como um exemplo de verificação manual da qualidade do gene *ARMC5*, nota-se ausência de cobertura em várias regiões do gene, assim como também uma possível contaminação de um *amplicon* de PCR em um dos éxons do gene (Figura 13).

Figura 13: Visualização no IGV do gene ARMC5 e sua cobertura em 3 amostras



Fonte – IGV/Emedgene (Autora)

Adicionalmente foi realizado o teste de identidade (parentesco) de amostras para avaliar a concordância dos genótipos entre os familiares (estrutura ortogonal e/ou familiar) em relação ao heredograma. Através dos dados da ferramenta, foi possível extrair três informações importantes:

1. a % de similaridade genotípica entre cada parente;
2. o número de variantes não idênticas entre eles;
3. se o dado encontrado estaria ou não de acordo com o heredograma.

É importante notar que indivíduos que deveriam compartilhar 50% da carga genética por se tratar de relativos próximos como as amostras ADT45_10 e ADT45_13, mostraram um número negativo de -15.9%, significando ausência completa de compartilhamento genético e ausência de cobertura em regiões distintas. Não somente estas amostras falharam, mas vários outros indivíduos demonstraram resultados equivalentes (Anexo 1: aba Pedigree).

5 DISCUSSÃO

Através da análise dos dados deste sequenciamento, é possível afirmar que a qualidade do material não era a ideal para a realização deste estudo considerando as boas práticas de sequenciamento por WGS.

Conforme ilustrado na Tabela 4, identificamos uma significativa discrepância entre as coberturas vertical e horizontal, assim como também a relação entre as métricas horizontais de 10x e 20x. Isso provavelmente se dá pelo fato da baixa qualidade das amostras e o uso do Repli-g gerando regiões sem leituras comparadas a regiões extremamente enriquecidas. Além disso, a presença do alinhamento de dímeros de primers reforça a comprovação de que a quantidade reduzida de material genômico impactou no funcionamento da técnica Repli-g

Ademais, a alta taxa de erro no sequenciamento, atribuída à baixa qualidade das amostras e excesso de adaptadores reduzindo a diversidade de sequenciamento, juntamente com falhas inerentes à técnica de Repli-g, contribuiu significativamente para um dos problemas de qualidade encontrados na análise dos dados. Questões como regiões sem cobertura adequada, baixa uniformidade, e um perfil de contaminação evidente nos resultados, possuem impacto direto na precisão dos resultados obtidos, especialmente no que se refere à porcentagem de similaridade genotípica entre os membros da família estudada.

É importante notar que o dado de parentesco de grande parte da família correspondeu com o heredograma disponibilizado previamente, porém existem discrepâncias que são importantes a serem levantadas como no caso das irmãs ADT45_10 e ADT45_13. O dado genético referente a estas amostras acusa não existir parentesco entre elas assim como também entre os dados sequenciados de suas tias. Vale ressaltar que estas duas amostras obtiveram não só os piores resultados de cobertura como também a pior taxa de erro de chamada de variante, corroborando com a suspeita de contaminação com outras amostras que não as deste estudo, reduzindo assim a similaridade do material genético em comparação aos outros membros, visto que este tipo de contaminação simula uma diluição do material genético original do indivíduo. Isso não acontece apenas para estas amostras, mas também para outros indivíduos como os ADT45_08 e ADT45_09 em que apesar de serem irmãos e esperava-se encontrar 50% de similaridade foi identificado apenas 19.9%. Em consulta a documentação da ferramenta Emedgene, foi visto que é utilizado um segundo instrumento de análise chamado Peddy para a realização da análise de pedigree

(PEDERSEN AND QUINLAN 2017). Apesar da Illumina não deixar claro quais parâmetros foram utilizados nesta ferramenta, pode se levantar algumas hipóteses:

- A qualidade das amostras inviabilizou o sequenciamento gerando erros de leitura e ausência de dados reais;
- As amostras não pertencem aos indivíduos supostos (possível troca e/ou contaminação cruzada com outro material genético que não da presente família);
- Os indivíduos podem ser adotados e nunca foram informados pelos seus respectivos pais, além de não ter sido informado em nenhuma documentação enviada junto com as amostras.

As principais amostras deste estudo para a busca de variantes candidatas a PBMAH eram as amostras referentes a paciente afetada ADT45_28 e as irmãs mencionadas anteriormente ADT45_10 e ADT45_13 por serem descendentes diretos de um membro afetado. A baixa qualidade do sequenciamento destes e todos os demais pacientes impossibilitou uma análise de dados confiável e conseqüentemente a sua filtragem.

A compreensão dos genes e das vias de sinalização envolvidos na PBMAH, bem como em condições correlatas - que afetam os mesmos órgãos - e HPOs possui um importante papel na orientação para a filtragem das variantes genéticas potenciais. Entretanto, a relevância desses aspectos genéticos só pode começar a ser avaliada nas amostras se os dados passaram por métricas de qualidade confiáveis. Notamos que é crucial a adoção de práticas rigorosas de qualidade e rastreabilidade em toda a pesquisa. Assim como já ocorre no diagnóstico clínico, onde a precisão e a confiabilidade são fundamentais, na pesquisa científica, a garantia de qualidade desde a coleta até a análise das amostras também é essencial. Isso previne problemas como perda de material, desperdício de insumos, contaminações e outros fatores que podem comprometer os estudos e levar a resultados imprecisos. A pesquisa científica estabelece as bases para os avanços futuros e suas aplicações, impactando diretamente a população que se beneficiará das descobertas e diretrizes desenvolvidas. Dito isto, é de grande ganho à todos a implementação de passos que visam a garantia da obtenção de dados com qualidade e confiabilidade.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os marcadores genéticos possuem um importante papel no aconselhamento genético de famílias e são fundamentais para a caracterização precisa da doença, bem como o aprimoramento das diretrizes de tratamento.

Embora a Síndrome de Cushing apresente características físicas marcantes, ela permanece subdiagnosticada. O aprofundamento no conhecimento sobre a SC é essencial para o diagnóstico de suas outras condições como a PBMAH, ajudando desde sua descoberta precoce até a prevenção de complicações.

A divulgação ampla da doença, incluindo seus sintomas e características laboratoriais, tem o potencial de melhorar significativamente a qualidade de vida da população. A detecção precoce e o tratamento adequado podem reduzir comorbidades e impactar positivamente os custos de saúde, além de promover um envelhecimento saudável e independente para os pacientes.

Além disso, o esclarecimento sobre seus sinais clínicos nos traz a possibilidade de identificação de novos pacientes, permitindo o acesso a uma maior quantidade de amostras para estudos moleculares robustos. O subdiagnóstico da doença representa uma dificuldade na identificação e acesso a amostras clínicas de indivíduos com segregação comprovada da doença entre os membros da família. O conjunto de amostras utilizadas no presente estudo, representa uma destas raras famílias onde observamos a segregação da doença entre seus membros, por este motivo, este material vem sendo utilizado ao longo dos anos até sua completa escassez.

É importante mencionar que os obstáculos enfrentados durante esta pesquisa refletem desafios comuns que podem ser encontrados tanto em laboratórios clínicos e na investigação de outras doenças, quanto na pesquisa científica.

A realização deste estudo com a técnica de genoma trouxe alguns levantamentos extremamente importantes a serem não só discutidos no laboratório em questão, mas também na comunidade científica. A quantidade de recursos, tempo e esforço gastos, assim como as pessoas envolvidas na utilização dessas amostras na tentativa de identificar genes candidatos a PBMAH, superou em muito os gastos atuais do uso da técnica de genoma nesta família. Levando em consideração que outras técnicas de PCR e de captura para regiões específicas não possuem todas as informações necessárias para definir parentesco entre as amostras, não é possível mensurar os custos possíveis erros de pesquisa com amostras trocadas ou até mesmo sem parentesco – adoções não informadas – com famílias afetadas. A afirmação de que todos os membros eram parentes sem testes

de paternidade pode não só ter de impedir a identificação dos agentes responsáveis segregando entre os familiares como também direcionar gastos de recursos para estudos mais assertivos.

Esta pesquisa ressalta a vulnerabilidade intrínseca das amostras e reagentes à contaminação, mesmo sob rigorosas condições de qualidade laboratorial. A contaminação observada neste estudo ilustra como até pequenas falhas no manuseio ou armazenamento podem comprometer significativamente a integridade dos dados. Esta observação chama a atenção para a necessidade de protocolos mais robustos e vigilância constante durante todas as fases do processo de sequenciamento. O impacto da contaminação nos resultados foi evidente, pois afetou a confiabilidade das análises genéticas, levando a possíveis erros de interpretação relacionados à similaridade genotípica e à identificação de variantes.

A experiência com este estudo ressalta a importância de explorar tecnologias atuais para o sequenciamento de genoma completo para pesquisas futuras. A adoção de uma única técnica, ainda que mais custosa, que proporciona uma gama diversificada de resultados — desde a chamada de SNVs e MNVs, até a detecção de SVs, CNVs e STRs, e avaliações qualitativas indiretas como a determinação de paternidade, coeficiente de contaminação e a confiabilidade global dos dados — não só previne a manipulações das amostras e reduzindo o risco de contaminação, mas também a geração de dados que podem ser reutilizados em análises futuras com a evolução dos pipelines e do conhecimento do genoma humano.

7 REFERÊNCIAS

- Araujo-Castro, M., and M. Marazuela, 2022 Cushing's syndrome due to bilateral adrenal cortical disease: Bilateral macronodular adrenal cortical disease and bilateral micronodular adrenal cortical disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 913253.
- Assie, G., E. Letouze, M. Fassnacht, A. Jouinot, W. Luscap *et al.*, 2014 Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet* 46: 607-612.
- Assie, G., R. Libe, S. Espiard, M. Rizk-Rabin, A. Guimier *et al.*, 2013 ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 369: 2105-2114.
- Austin-Tse, C. A., V. Jobanputra, D. L. Perry, D. Bick, R. J. Taft *et al.*, 2022 Best practices for the interpretation and reporting of clinical whole genome sequencing. *NPJ Genom Med* 7: 27.
- Bengoa-Rojano, N., M. Fernandez-Argueso, J. I. Botella-Carretero, E. Pascual-Corrales and M. Araujo-Castro, 2022 Prevalence and phenotype of primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia with autonomous cortisol secretion: a study of 98 patients. *Rev Clin Esp (Barc)* 222: 458-467.
- Bertherat, J., I. Bourdeau, L. Bouys, F. Chasseloup, P. Kamenicky *et al.*, 2023 Clinical, Pathophysiologic, Genetic, and Therapeutic Progress in Primary Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia. *Endocr Rev* 44: 567-628.
- Beuschlein, F., M. Fassnacht, G. Assie, D. Calebiro, C. A. Stratakis *et al.*, 2014 Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 370: 1019-1028.
- Bornstein, S. R., W. C. Engeland, M. Ehrhart-Bornstein and J. P. Herman, 2008 Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab* 19: 175-180.
- Bouys, L., I. Chiodini, W. Arlt, M. Reincke and J. Bertherat, 2021 Update on primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia (PBMAH). *Endocrine* 71: 595-603.
- Bunevicius, A., E. R. Laws, M. L. Vance, S. Iuliano and J. Sheehan, 2019 Surgical and radiosurgical treatment strategies for Cushing's disease. *J Neurooncol* 145: 403-413.
- Cavalcante, I. P., A. Berthon, M. C. Fragoso, M. Reincke, C. A. Stratakis *et al.*, 2022 Primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia: definitely a genetic disease. *Nat Rev Endocrinol* 18: 699-711.
- Chang, M., C. Yang, X. Bao and R. Wang, 2020 Genetic and Epigenetic Causes of Pituitary Adenomas. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11: 596554.
- Charchar, H. L. S., and M. Fragoso, 2022 An Overview of the Heterogeneous Causes of Cushing Syndrome Resulting From Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia (PMAH). *J Endocr Soc* 6: bvac041.
- Damjanovic, S. S., J. A. Antic, V. I. Elezovic-Kovacevic, D. M. Dundjerovic, I. T. Milicevic *et al.*, 2020 ARMC5 Alterations in Patients With Sporadic Neuroendocrine Tumors and Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab* 105: e4531-4542.
- Directors, A. B. o., 2012 Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. *Genet Med* 14: 759-761.
- Faillot, S., T. Foulonneau, M. Neou, S. Espiard, S. Garinet *et al.*, 2021 Genomic classification of benign adrenocortical lesions. *Endocr Relat Cancer* 28: 79-95.
- Fassnacht, M., S. Tsagarakis, M. Terzolo, A. Tabarin, A. Sahdev *et al.*, 2023 European Society of Endocrinology clinical practice guidelines on the management of adrenal incidentalomas, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol* 189: G1-G42.
- Grumbach, M. M., B. M. Biller, G. D. Braunstein, K. K. Campbell, J. A. Carney *et al.*, 2003 Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *Ann Intern Med* 138: 424-429.
- Hacioglu, A., S. T. Firat, A. S. Caglar, Z. Karaca, N. Kalay *et al.*, 2024 Cardiovascular evaluation and endothelial dysfunction in Cushing syndrome following remission: a prospective study. *J Endocrinol Invest* 47: 645-653.

- Hackl, M., V. Jadhav, T. Jakobi, O. Rupp, K. Brinkrolf *et al.*, 2012 Computational identification of microRNA gene loci and precursor microRNA sequences in CHO cell lines. *J Biotechnol* 158: 151-155.
- Hara, K., M. Murakami, Y. Niitsu, A. Takeuchi, M. Horino *et al.*, 2022 Heterogeneous circulating miRNA profiles of PBMAH. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 1073328.
- He, W. T., X. Wang, W. Song, X. D. Song, Y. J. Lu *et al.*, 2021 A novel nonsense mutation in ARMC5 causes primary bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia. *BMC Med Genomics* 14: 126.
- Juanchich, A., P. Bardou, O. Rue, J. C. Gabillard, C. Gaspin *et al.*, 2016 Characterization of an extensive rainbow trout miRNA transcriptome by next generation sequencing. *BMC Genomics* 17: 164.
- Kirschner, M. A., R. D. Powell, Jr. and M. B. Lipsett, 1964 Cushing's Syndrome: Nodular Cortical Hyperplasia of Adrenal Glands with Clinical and Pathological Features Suggesting Adrenocortical Tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 24: 947-955.
- Lomte, N., T. Bandgar, S. Khare, S. Jadhav, A. Lila *et al.*, 2016 Bilateral adrenal masses: a single-centre experience. *Endocr Connect* 5: 92-100.
- Marcinkowska, M., M. Szymanski, W. J. Krzyzosiak and P. Kozlowski, 2011 Copy number variation of microRNA genes in the human genome. *BMC Genomics* 12: 183.
- Marshall, C. R., S. Chowdhury, R. J. Taft, M. S. Lebo, J. G. Buchan *et al.*, 2020 Best practices for the analytical validation of clinical whole-genome sequencing intended for the diagnosis of germline disease. *NPJ Genom Med* 5: 47.
- Nieman, L. K., B. M. Biller, J. W. Findling, J. Newell-Price, M. O. Savage *et al.*, 2008 The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1526-1540.
- Nies, C., D. K. Bartsch, K. Ehlenz, A. Wild, P. Langer *et al.*, 2002 Familial ACTH-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia clinically affecting only female family members. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110: 277-283.
- O'Brien, J., H. Hayder, Y. Zayed and C. Peng, 2018 Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 402.
- Olson, N. D., J. Wagner, J. McDaniel, S. H. Stephens, S. T. Westreich *et al.*, 2022 PrecisionFDA Truth Challenge V2: Calling variants from short and long reads in difficult-to-map regions. *Cell Genom* 2.
- Pedersen, B. S., and A. R. Quinlan, 2017 Who's Who? Detecting and Resolving Sample Anomalies in Human DNA Sequencing Studies with Peddy. *Am J Hum Genet* 100: 406-413.
- Petrackova, A., M. Vasinek, L. Sedlarikova, T. Dyskova, P. Schneiderova *et al.*, 2019 Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. *Front Oncol* 9: 851.
- Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das *et al.*, 2015 Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17: 405-424.
- Sherlock, M., A. Scarsbrook, A. Abbas, S. Fraser, P. Limumpornpetch *et al.*, 2020 Adrenal Incidentaloma. *Endocr Rev* 41: 775-820.
- Stratakis, C. A., 2008 Cushing syndrome caused by adrenocortical tumors and hyperplasias (corticotropin-independent Cushing syndrome). *Endocr Dev* 13: 117-132.
- Stratakis, C. A., and S. A. Boikos, 2007 Genetics of adrenal tumors associated with Cushing's syndrome: a new classification for bilateral adrenocortical hyperplasias. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 748-757.

- Sung, T. Y., L. Tennakoon, W. M. Alobuia, C. Seib, R. Cisco *et al.*, 2022 Factors associated with postoperative complications and costs for adrenalectomy in benign adrenal disorders. *Surgery* 171: 1519-1525.
- Tatsi, C., C. Flippo and C. A. Stratakis, 2020 Cushing syndrome: Old and new genes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 34: 101418.
- Vetrivel, S., R. Zhang, M. Engel, A. Osswald, D. Watts *et al.*, 2022 Characterization of Adrenal miRNA-Based Dysregulations in Cushing's Syndrome. *Int J Mol Sci* 23.
- Yang, Z., X. Yang, Y. Sun, Y. Wang, L. Song *et al.*, 2023 Test development, optimization and validation of a WGS pipeline for genetic disorders. *BMC Med Genomics* 16: 74.
- Zhou, J., M. Zhang, X. Bai, S. Cui, C. Pang *et al.*, 2019 Demographic Characteristics, Etiology, and Comorbidities of Patients with Cushing's Syndrome: A 10-Year Retrospective Study at a Large General Hospital in China. *Int J Endocrinol* 2019: 7159696.

8 CURRÍCULO LATTES DURANTE O VÍNCULO COM O PPGGBM

Geórgia Fernanda de Oliveira
Curriculum Vitae

Fevereiro/2024

Geórgia Fernanda de Oliveira
Curriculum Vitae

Nome Geórgia Fernanda de Oliveira

Dados pessoais

Nome em citações bibliográficas OLIVEIRA, G. F.;Oliveira, Geórgia Fernanda de

Sexo Feminino

URL da home page: <https://www.linkedin.com/in/georgiafoliveira/>

Endereço eletrônico georgiaf.oliveira@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2021** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Investigação Molecular de PBMAH Familiar Sem Causa Genética Esclarecida
Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
Co-orientador: Fábio Rueda Faucz
Palavras-chave: PBMAH, Variantes, Bioinformática, WGS
Áreas do conhecimento: Genética Humana e Médica, Biologia Molecular
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico
- 2013 - 2014** Especialização em Especialização em Diagnóstico Molecular.
Faculdade Pernambucana de Saúde, FPS, Recife, Brasil
Título: Avaliação de NEK quinases como alvo farmacológico contra leishmanioses por métodos em bioinformática.
Orientador: Rafael de Freitas e Silva
- 2010 - 2013** Graduação em Biomedicina.
Associação Caruaruense de Ensino Superior, ASCES, Caruaru, Brasil
Título: Perfil hepático de dependentes da substância simpaticomimética cocaína, em processo terapêutico.
Orientador: Franklin Barbalho Magalhães
- 2006 - 2008** Ensino Médio (2o grau) .
Colégio Nicanor Souto Maior, CNSM, Brasil

Formação complementar

- 2020 - 2020** Formação Lean Six Sigma Green Belt(Carga horária: 40h).
Oporto Brazil, OPORTO BR, Jaboatao Dos Guararapes, Brasil
Palavras-chave: Lean Six Sigma, Green Belt
- 2018 - 2018** Curso de curta duração em Gestão de Processos em Saúde. (Carga horária: 30h).
Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Sao Paulo, Brasil
Palavras-chave: Gestão de Processos
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Monitoramento Molecular de Pacientes com LMC. (Carga horária: 16h).
Instituto Nacional de Câncer, INCA, Rio De Janeiro, Brasil
Palavras-chave: LMC
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Imunologia Celular e Molecular. (Carga horária: 30h).
Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, IMIP, Recife, Brasil
Palavras-chave: Imunologia
- 2013 - 2014** Especialização em Diagnóstico Molecular. (Carga horária: 360h).
Faculdade Pernambucana de Saúde, FPS, Recife, Brasil
Palavras-chave: Diagnóstico Molecular
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Desenvolvimento de Marcadores de Microssatélite. (Carga horária: 4h).
Associação Caruaruense de Ensino Superior, ASCES, Caruaru, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Oncohematologia. (Carga horária: 4h).
Associação Caruaruense de Ensino Superior, ASCES, Caruaru, Brasil
- 2011 - 2011** Extensão universitária em Biologia Molecular no Diagnóstico de Doenças. (Carga horária: 20h).
Aprimora Cursos, APRIMORA, Brasil
- 2010 - 2010** Extensão universitária em Hemograma: Tecnologia e interpretação. (Carga horária: 4h).
Associação Caruaruense de Ensino Superior, ASCES, Caruaru, Brasil
- 2008 - 2008** Auxiliar Administrativo em Comércio de Bens e Serviços. (Carga horária: 920h).
Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial - PE, SENAC/PE, Recife, Brasil

Atuação profissional**1. Mobius - MOBIUS**

Vínculo institucional

2022 - 2023 Vínculo: Gestora, Enquadramento funcional: Supervisora de Assessoria Científica, Carga horária: 40, Regime: Integral

2. Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE

Vínculo institucional

2020 - 2022 Vínculo: Analista Sênior, Enquadramento funcional: Analista - Sênior, Carga horária: 40, Regime: Integral

3. Genomika Diagnósticos - GD

Vínculo institucional

2013 - 2020 Vínculo: BIOMÉDICA, Enquadramento funcional: Analista – Jr. a Pleno, Carga horária: 40, Regime: Integral

4. HLA Diagnóstico - HLA

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 30, Regime: Parcial

5. Hospital Agamenon Magalhães - HAM

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 30, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa

2012 - 2012 AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE ZONOSSES EM AMBIENTES PÚBLICOS DESTINADOS A ENTRETENIMENTO INFANTIL NA CIDADE DE CARUARU - PE.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3);

Integrantes: Geórgia Fernanda de Oliveira; Ana Cecília Cavalcanti Albuquerque (Responsável); Ayslan Carvalho de Melo; Lucas Gabriel Sousa Santos

2012 - 2013 Perfil hepático de dependentes da substância simpaticomimética cocaína, em processo terapêutico.

Descrição: Avaliação através da dosagem de marcadores hepáticos e anti-HCV com o objetivo de correlacionar alterações hepáticas com a terapêutica utilizada em clínicas de reabilitação.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (2); Doutorado (1);

Integrantes: Geórgia Fernanda de Oliveira (Responsável); ; Crhisllane Rafale dos Santos Vasconcelos; Franklin barbalho magalhães; michael azevedo costa de paula

Projeto de extensão

2012 - 2013 Praticando Ciência

Descrição: O objetivo do projeto é incentivar a pesquisa científica aos alunos de ensino médio ao mesmo tempo em que possibilita aos alunos dos cursos de saúde de graduação da ASCES treinar a prática didática.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Geórgia Fernanda de Oliveira (Responsável); ; Ana Cecília Cavalcanti Albuquerque

2012 - 2012 Projeto Águas do Agreste

Descrição: O Projeto Águas do Agreste é um projeto sócio-educacional que visa a promoção da saúde em escolas de nível fundamental do Agreste pernambucano.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (28);

Integrantes: Geórgia Fernanda de Oliveira (Responsável); ; Agenor Jácome Junior

Áreas de atuação

1. Genética
 2. Biologia Molecular
 3. Genética Médica
-

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
Espanhol	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente , Lê Bem
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Capítulos de livros publicados

1. Silva, Ana Carolina Branco Neves; **Oliveira, Geórgia Fernanda de**; Bernardo, Raíssa Nogueira
ONCOVÍRUS In: Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes.3 ed.: Latin American Publicações, 2022, p. 99-122.

Referências adicionais: Brasil/Português. ISBN: 9786599654503, Home page: <https://latinamericanpublicacoes.com.br/assets/ebooks/vCeX473P0HhuLz7VcD0K62k69mT8yB59.pdf>

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **OLIVEIRA, G. F.**; Laís Rodrigues Moura; Jobson Ferraz do Nascimento; Nara Diniz Soares Pessoa; Danilo Luiz Soares Barbosa; Rodrigo Bertollo de Alexandre; Mariana Rezende Bandeira de Melo; Cheysa Arielly Biondo; Marcel Caraciolo; João Bosco Oliveira Filho

Prevalence of Pathogenic/Likely Pathogenic and unknown clinical significance variants among 385 patients referred for NGS-based Multigene Hereditary Cancer Panel In: XXIX Congresso Brasileiro de Genética Médica 2017, 2017, Bento Gonçalves.

XXIX Congresso Brasileiro de Genética Médica 2017. , 2017.

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://www.sbgm.org.br/imagens/conteudo/files/ANAIS.compressed.pdf]

2. Nara Diniz Soares Pessoa; **OLIVEIRA, G. F.**; Rodrigo Bertollo de Alexandre; Cheysa Arielly Biondo; Brena de Souza Hampel; Jobson Ferraz do Nascimento; Marcel Caraciolo; Ana Paula de Andrade;; Renata Correia de Andrade; João Bosco Oliveira Filho

Prevalence of positive findings with the use of a NGS-based RNA and DNA sequencing multigene panel in solid tumors for therapy guidance In: XXIX Congresso Brasileiro de Genética Médica 2017, 2017, Bento Gonçalves.

XXIX Congresso Brasileiro de Genética Médica 2017. , 2017.

Referências adicionais: Brasil/Português. Home page: [http://www.sbgm.org.br/imagens/conteudo/files/ANAIS.compressed.pdf]

3. **OLIVEIRA, G. F.**; LIMA, K. F.; BRITO, T.; SILVA, L. C. N.

Efeito Preventivo do Aleitamento Materno nos Distúrbios Alergológicos Incidentes em Neonatos In: III Congresso de Biomedicina e Farmácia da Faculdade ASCES, 2012, Caruaru.

Efeito Preventivo do Aleitamento Materno nos Distúrbios Alergológicos Incidentes em Neonatos. Caruaru: , 2012. p.40 - 40

Palavras-chave: Alergia, Neonatos, Aleitamento Materno

Áreas do conhecimento: Imunologia, Genética Humana, Bioquímica

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: [http://www.asc.es.edu.br/downloads/18_06_2012_16_25_f8315265c3e3ca904aa91e32b9a485a3.pdf]

Apresentação de trabalho e palestra

1. **OLIVEIRA, G. F.**

Risco Hereditário de Câncer - Rastreio, Prevenção e Diagnóstico Precoce, 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Câncer, Diagnóstico Precoce, Rastreio

Áreas do conhecimento: Genética, Gnéctica Médica

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Auditório Capiba; Cidade: Recife; Evento: Workshop Multiprofissional em Oncologia; Inst.promotora/financiadora: Centro Universitário Maurício de Nassau

2. **OLIVEIRA, G. F.**; LIMA, K. F.; SILVA, L. C. N.; BRITO, T.

Efeito Preventivo do Aleitamento Materno nos Distúrbios Alergológicos Incidentes em Neonatos, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento: Genética, Imunologia

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: http://www.asc.es.edu.br/downloads/18_06_2012_16_25_f8315265c3e3ca904aa91e32b9a485a3.pdf

Produção técnica

Redes sociais, websites, blogs

1. **OLIVEIRA, G. F.**

Do DNA ao Sequenciamento em Massa, 2020

Referências adicionais: Brasil/Português. Home page: https://blog.varsomics.com/en/from-dna-to-bulk-sequencing/

Inovação Projetos

Projeto de extensão

2012 - 2012 Projeto Águas do Agreste

Descrição: O Projeto Águas do Agreste é um projeto sócio-educacional que visa a promoção da saúde em escolas de nível fundamental do Agreste pernambucano.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (28);

Integrantes: Geórgia Fernanda de Oliveira (Responsável); Agenor Jácome Junior

2012 - 2013 Praticando Ciência

Descrição: O objetivo do projeto é incentivar a pesquisa científica aos alunos de ensino médio ao mesmo tempo em que possibilita aos alunos dos cursos de saúde de graduação da ASCES treinar a prática didática.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Geórgia Fernanda de Oliveira (Responsável); Ana Cecília Cavalcanti Albuquerque

Educação e Popularização de C&T

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **OLIVEIRA, G. F.**; LIMA, K. F.; BRITO, T.; SILVA, L. C. N.

Efeito Preventivo do Aleitamento Materno nos Distúrbios Alergológicos Incidentes em Neonatos In: III Congresso de Biomedicina e Farmácia da Faculdade ASCES, 2012, Caruaru.

Efeito Preventivo do Aleitamento Materno nos Distúrbios Alergológicos Incidentes em Neonatos. Caruaru: , 2012. p.40 - 40

Palavras-chave: Alergia, Neonatos, Aleitamento Materno

Áreas do conhecimento: Imunologia, Genética Humana, Bioquímica

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: [http://www.asc.es.edu.br/downloads/18_06_2012_16_25_f8315265c3e3ca904aa91e32b9a485a3.pdf]

Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. **Congresso Brasileiro de Bioinformática: X-Meeting**, 2023. (Congresso)

2. **Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial - SBPC**, 2023. (Congresso)

3. **Congresso Brasileiro de Hansenologia**, 2022. (Congresso)

4. **Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial - SBPC**, 2022. (Congresso)

5. **Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – MEDTROP**, 2022. (Congresso)

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIX Congresso Brasileiro de Genética Médica 2017**, 2017. (Congresso)

Prevalence of Pathogenic/Likely Pathogenic and unknown clinical significance variants

among 385 patients referred for NGS-based Multigene Hereditary Cancer Panel.

7. **1º Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental**, 2011. (Congresso)
8. **XI International Symposium on Experimental Techniques**, 2011. (Simpósio)
9. **II congresso de Biomedicina e Farmácia da Faculdade ASCES**, 2010. (Congresso)

Redes sociais, websites e blogs

1. OLIVEIRA, G. F.

Do DNA ao Sequenciamento em Massa, 2020. (Blog, Mídias sociais, websites, blogs)

Referências adicionais: Brasil/Português. Home page: <https://blog.varsomics.com/en/from-dna-to-bulk-sequencing/>

Eventos

Participação em eventos

1. **Congresso Brasileiro de Bioinformática: X-Meeting**, 2023. (Congresso)
2. **Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial - SBPC**, 2023. (Congresso)
3. **Congresso Brasileiro de Hansenologia**, 2022. (Congresso)
4. **Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial - SBPC**, 2022. (Congresso)
5. **Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – MEDTROP**, 2022. (Congresso)
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIX Congresso Brasileiro de Genética Médica 2017**, 2017. (Congresso)
Prevalence of Pathogenic/Likely Pathogenic and unknown clinical significance variants among 385 patients referred for NGS-based Multigene Hereditary Cancer Panel.
7. **1º Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental**, 2011. (Congresso)
8. **XI International Symposium on Experimental Techniques**, 2011. (Simpósio)
9. **II congresso de Biomedicina e Farmácia da Faculdade ASCES**, 2010. (Congresso)

Organização de evento

1. OLIVEIRA, G. F.

III Congresso de Biomedicina e Farmácia, 2012. (Congresso, Organização de evento)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

2. OLIVEIRA, G. F.

Universo Nogg – anual 2013 - presente. (Organização de evento)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

Totais de produção

Produção bibliográfica

Capítulos de livros publicados.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	3
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	1
Apresentações de trabalhos (Outra).....	1

Produção técnica

Blog.....	1
-----------	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	8
Participações em eventos (simpósio).....	1
Organização de evento (congresso).....	1
Organização de evento (outros).....	1

ANEXO A – Planilha PBMAH – Defesa

Anexo A – Documento em formato excel contendo:

Lista de Genes

Lista de miRNAs

Lista de HPOs

Materiais e Equipamentos

Quantificação das amostras

Links para download dos protocolos de bancada utilizados

Versões Emedgene

Pedigree