

Análise, implementação e validação da metodologia NGS em painéis somáticos de cancro

Ana Teresa Torres Fernandes

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia

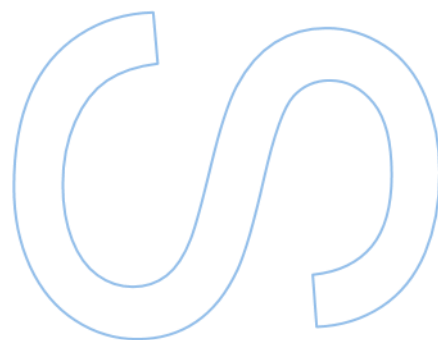
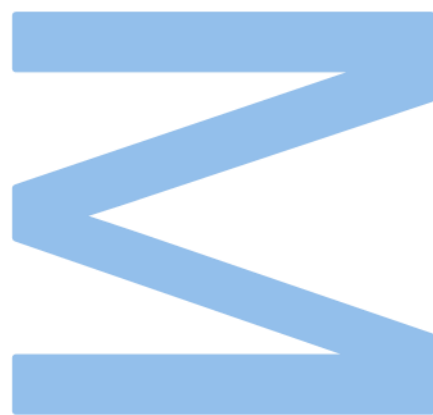
2022

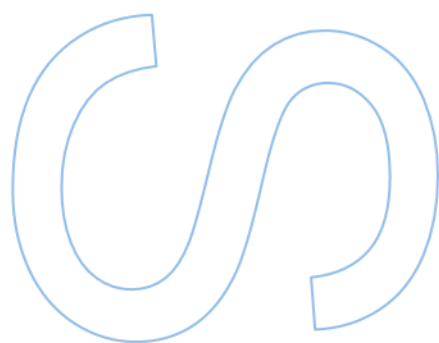
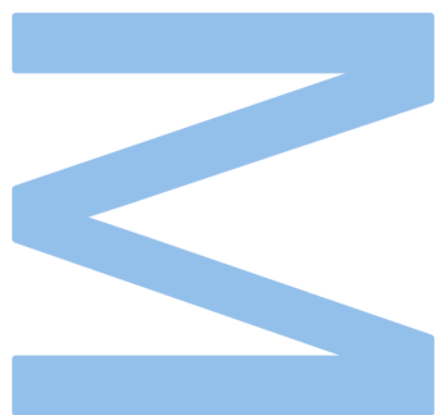
Orientador

Vasco Manuel Leal Martins de Almeida, Professor Auxiliar, FCUP

Supervisora na Instituição de Acolhimento

Mariana Cruz da Costa, Molecular Pathology Manager, Unilabs





Declaração de Honra

Eu, Ana Teresa Torres Fernandes, inscrita no Mestrado em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U.Porto, que o conteúdo do presente relatório de estágio reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar este relatório de estágio, declaro, ainda, que a mesma é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados no presente relatório de estágio quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Ana Teresa Torres Fernandes

Porto, 5 de Janeiro de 2023

Agradecimentos

A realização e concretização deste relatório de estágio só foi possível devido aos apoios e incentivos de vários intervenientes, sem os quais este projeto não teria sido possível.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao professor Vasco Almeida, por me ter dado a conhecer este projeto, pela disponibilidade constante, pela ajuda, e por toda a dedicação e esforço para que este estágio se concretizasse.

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, por me ter dado a possibilidade de realizar e completar a minha formação académica na minha área de interesse, por tudo o que aprendi, por me ter permitido conhecer professores e colegas excelentes, assim como amigos que levo para a vida.

À Unilabs Portugal e ao Dr. Diogo Garcez em sua representação, pela oportunidade de estágio, pelo voto de confiança, e por terem possibilitado esta experiência de estágio em contexto empresarial.

À Mariana Costa, minha supervisora na instituição de acolhimento, pela simpatia constante, por tudo o que aprendi e por toda a ajuda no desenvolvimento deste projeto.

À Teresa Figueiredo, por todas as dicas e sugestões, por tudo o que me ensinou acerca de gestão empresarial e por todo o apoio prestado durante o estágio.

À minha colega de estágio, Carolina Carreira, por todo o apoio, pela companhia, pela partilha do gosto pela área e pelo espírito de entreajuda.

A toda a minha família e em especial aos meus pais, pela motivação, por acreditarem em mim, por estarem sempre ao meu lado e sempre prontos para me ajudar e apoiar.

Aos meus amigos, por todos os convívios, todas as conversas e bons momentos.

A ti, Diogo, por todo o incentivo e compreensão, e por estares sempre lá para mim.

Gostaria também de deixar um agradecimento muito especial a todos os colaboradores da Unilabs Portugal com os quais contactei, pela partilha de conhecimentos, pelos bons momentos e pela boa disposição constante.

Por fim, aproveito para agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu percurso académico, pessoal e profissional.

A todos vocês, o meu obrigada!

Resumo

Se recuarmos no tempo até há cerca de cem anos, a doença oncológica não era tão conhecida nem falada como é nos dias de hoje. No entanto, nas últimas décadas, a sua incidência tem vindo a aumentar de forma alarmante. Este aumento deveu-se, sobretudo, ao facto de atualmente ser possível diagnosticar lesões em fase pré-invasiva através de metodologias inovadoras, às mudanças no estilo de vida e hábitos de consumo, mas também ao aumento da esperança média de vida da população.

Desta forma, torna-se crucial o recurso a tecnologias de diagnóstico clínico para identificação e deteção de mutações somáticas, em genes conhecidos pelo seu papel no desenvolvimento de patologias oncológicas, com maior especificidade e no menor espaço de tempo possível.

Entre estas tecnologias de diagnóstico podemos destacar a Sequenciação de Nova Geração, tecnologia esta que permite, numa única experiência, a determinação de sequências de moléculas de DNA com tamanhos superiores a 1 milhão de bases, podendo até sequenciar o genoma total de um indivíduo.

Assim, o objetivo primordial deste trabalho prende-se com a análise, implementação e validação da tecnologia de Sequenciação de Nova Geração de painéis somáticos de cancro, com vista à identificação de mutações somáticas relevantes na terapêutica e caracterização de tumores.

Este trabalho foi desenvolvido e realizado no laboratório da unidade de Biologia Molecular, pertencente à Unilabs Portugal S.A., uma empresa líder no setor do diagnóstico clínico.

Com vista a alcançar os objetivos propostos, inicialmente foi analisado e estudado o equipamento *Genexus*, comercializado pela Thermo Fisher Scientific TM.

Foi também definido um protocolo laboratorial a seguir, tendo em vista a utilização do equipamento.

Em suma, podemos dizer que o diagnóstico clínico com base em técnicas de Sequenciação de Nova Geração é uma área em constante evolução e que procura proporcionar as melhores condições para, detetando lesões pré malignas, evitar o desenvolvimento da patologia oncológica ou detetá-la em fase mais precoce, e que permite também um maior número de opções de tratamento a todos aqueles que dela sejam beneficiários, pois oferece um diagnóstico mais específico e numa janela temporal menor.

Palavras-chave: *Next Generation Sequencing*, Sequenciação, *Genexus*, Cancro, Painéis Somáticos

Abstract

If we go back in time to about a hundred years ago, oncological diseases were not as well known or talked about as they are today. However, in recent decades, its incidence has increased alarmingly. This increase was mainly due to the fact that nowadays it is currently possible to diagnose lesions in the pre-invasive phase through innovative methodologies, to changes in lifestyle and consumption habits, but also to the increase in the average life expectancy of the population.

Therefore, it is crucial to take advantage of clinical diagnostic technologies in order to identify and detect somatic mutations in genes known for their role in the development of oncological pathologies, with greater specificity and in the shortest time possible.

Among these diagnostic technologies, we can highlight Next Generation Sequencing, a technology that allows, in a single assay, the determination of sequences of DNA molecules with sizes bigger than 1 million bases, being able to sequence the entire genome of an individual.

Thus, the main goal of this work was the analysis, implementation and validation of Next Generation Sequencing technology in somatic cancer panels, in order to identify somatic mutations relevant in the therapy and characterization of tumors.

This project was developed and processed in the laboratory of the Molecular Biology unit of Unilabs Portugal S.A., a leading company in the clinical diagnosis sector.

In order to achieve the proposed goals, the *Genexus* equipment, commercialized by Thermo Fisher Scientific TM, was initially analyzed and studied. In addition, a laboratory protocol was also defined to be followed, for the use of the equipment.

In summary, we can say that clinical diagnosis based on New Generation Sequencing techniques is an area in constant evolution and that aims to provide the best conditions in order to detect pre-cancerous lesions avoiding the development of oncological pathologies, and that also allows a greater number of treatment options, to all those who benefit from it, as it offers a more specific diagnosis and in a shorter time frame.

Keywords: *Next Generation Sequencing*, Sequencing, *Genexus*, Cancer, Somatic Panels

Índice

Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Gráficos.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Enquadramento Geral do Projeto.....	1
1. Introdução.....	2
1.1. Unilabs.....	2
1.1.1. Unilabs em Portugal.....	2
1.2. Cancro e Patologia Oncológica.....	4
1.3. Sequenciação de Nova Geração (NGS).....	6
1.3.1. Potenciais Utilizações da Tecnologia NGS na Prática Clínica.....	8
1.3.2. Limitações da Tecnologia NGS.....	10
1.4. Objetivos do Trabalho.....	11
2. Implementação do Método.....	12
2.1. Genexus System.....	12
2.2 Tecnologia Ion Torrent.....	17
2.3. Painéis Somáticos de Cancro.....	18
2.4. Procedimentos Laboratoriais.....	19
2.4.1 Procedimentos Laboratoriais no LAP – Laboratório de Anatomia Patológica.....	19
2.4.2 Procedimento para Utilização do Equipamento Genexus.....	22
3. Resultados/Discussão.....	24
3.1. Análise de custos resultantes da instalação, utilização do equipamento e investimento inicial.....	24
3.2. Ensaio-piloto.....	25

3.2.1. Validação do Kit de Extração.....	25
3.2.2. Validação dos Resultados Obtidos.....	27
4. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	30
5. Referências Bibliográficas.....	31
Anexo 1.....	34
Anexo 2.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1- Resultados obtidos utilizando diferentes kits de extração.....	26
Tabela 2- Resultados obtidos através da tecnologia de NGS pelo laboratório independente.....	27

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Resultados obtidos utilizando diferentes kits de extração.....	27
--	----

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema resumo da expansão da Unilabs Portugal ao longo do tempo	3
Figura 2 - Fases de Desenvolvimento de um tumor	5
Figura 3 - Representação esquemática dos resultados obtidos através da análise de células tumorais recorrendo à tecnologia de NGS e Sanger, respetivamente, e da sua comparação com células normais.....	7
Figura 4 - Esquema comparativo entre a técnica de Sanger e NGS.....	11
Figura 5 - Representação esquemática do equipamento <i>Genexus</i>	13
Figura 6 – Comparação entre o Sistema de Sequenciação <i>Genexus</i> e um sistema de sequenciação convencional.....	14
Figura 7 – Representação esquemática do procedimento efetuado pelo sistema <i>Genexus</i>	14
Figura 8 – Representação de um relatório emitido pelo sistema <i>Genexus</i>	16
Figura 9 – Aplicações Gerais do Sistema <i>Genexus</i> no mercado	17
Figura 10 – Micrótomo.....	21
Figura 11 – Esquematização do procedimento para utilização do equipamento.....	22
Figura 12 – Carregamento do Equipamento <i>Genexus</i>	24
Figura 13 – Resultados obtidos através da utilização do equipamento <i>Genexus</i>	28
Figura 14 - Relatório emitido pelo equipamento <i>Genexus</i> , indicando as terapêuticas mais adequadas para cada uma das mutações encontradas.....	29

Lista de Abreviaturas

ng	NANOGRAMAS
μL	MICROLITRO
ALK	ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE
CGH	COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONÚCLEICO
EGFR	EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR
ERBB2	ERB-B2 RECEPTOR TYROSINE KINASE 2
FFPE	FORMALIN-FIXED PARAFFIN-EMBEDDED
FISH	FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION
H&E	HEMATOXILINA-EOSINA
KBP	KILOBASE PAIRS
LAP	LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA
MBP	MEGA BASE PAIRS
NGS	NEXT GENERATION SEQUENCING
NTRK	NEUROTROPHIC TYROSINE RECEPTOR KINASE
PCR	POLIMERASE CHAIN REACTION
ROS	RECEPTOR TYROSINE KINASE

Enquadramento Geral do Projeto

A conceção deste projeto, que tem por base a aquisição de um equipamento de sequenciação de nova geração e o desenvolvimento do seu protocolo de aplicação laboratorial, surge da necessidade de oferecer e estabelecer no mercado do diagnóstico clínico, um serviço por parte de uma entidade privada, que permita a deteção de mutações somáticas que tenham contribuído ou venham a contribuir para o possível desenvolvimento de patologias oncológicas. Este serviço terá como público-alvo, sobretudo, clínicas e hospitais públicos e privados que, na presença de um doente de risco, pré-sintomático ou sintomático, queiram efetuar e confirmar o seu diagnóstico ou avaliar a possibilidade de este vir a desenvolver algum tipo de neoplasia no futuro próximo. Para além disso, este tipo de análise permitirá também saber qual a terapêutica mais indicada para cada tipo de mutação. Desta forma, poderão ser utilizados fármacos mais seletivos, que podem desacelerar o crescimento tumoral, preservando, desta forma, uma grande parte das células saudáveis.

Assim, a existência deste exame permitirá a eliminação da necessidade de subcontratação de outras entidades para a sua execução, assim como oferecer uma alternativa ao setor público para a sua realização, uma vez que é neste setor que, atualmente, se realizam a grande maioria deste tipo de análises e diagnósticos.

1. Introdução

1.1. Unilabs

O Grupo Unilabs, com sede em Genebra, é uma empresa multinacional Suíça que possui uma área de atuação a nível internacional, cujo foco é o diagnóstico clínico.

A Unilabs foi fundada em 1987 em Genebra, com filiais em Bern e St. Gallen. Em 1989, o grupo estabeleceu a sua presença em Itália e a expansão internacional continuou no ano seguinte com a aquisição de três laboratórios em Espanha. Como resultado, a Unilabs continuou a expandir as suas atividades através de aquisições de infraestruturas já existentes, e também através da abertura de novas instalações. Nos anos seguintes, cresceu rapidamente com uma estratégia de aquisição de laboratórios parceiros de alta qualidade e excelência em todo o continente europeu.

Atualmente, a Unilabs encontra-se presente em 16 países: Suíça, Portugal, Espanha, França, Suécia, Noruega, Finlândia, Dinamarca, Países Baixos, Reino Unido, Eslováquia, República Checa, Rússia, Peru, Emirados Árabes Unidos e Austrália.

Neste momento, o Grupo Unilabs conta com mais de 200 laboratórios, 180 centros de radiologia e um amplo catálogo de mais de 6.500 testes de diagnóstico tendo gerado vendas anuais de mais de 1,4 mil milhões de euros por ano, e sendo por isso considerada uma empresa europeia líder ao nível da realização de testes laboratoriais clínicos e de serviços de diagnóstico clínico integrado. ^{1,2}

1.1.1. Unilabs em Portugal

A Unilabs entrou no mercado de diagnóstico português em Janeiro de 2006, com a aquisição do grupo Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres. A partir daí, a Unilabs Portugal cresceu rapidamente adotando uma estratégia de aquisição de laboratórios e do estabelecimento de infraestruturas de elevada qualidade por todo o país, tal como representado na Figura 1. ^{1,2}



Fig. 1 – Esquema resumo da expansão da Unilabs Portugal ao longo do tempo.

(<https://www.unilabs.pt/unilabs/sobre-n%C3%B3s>)

Atualmente conta com diversas áreas de atuação em Portugal, nomeadamente na área de Cardiologia, Análises Clínicas, Radiologia, Anatomia Patológica, Medicina Nuclear, Gastroenterologia e Genética Médica.

Em Julho de 2014, foi integrado na Unilabs o LAP – Laboratório de Anatomia Patológica. Este laboratório está também na vanguarda na implementação de testes de Anatomia Patológica e de Biologia Molecular, acompanhando os avanços tecnológicos e científicos para realizar os exames e análises mais exigentes. Entre estes, podemos destacar o diagnóstico oncológico e o papel que a tecnologia de NGS desempenha na deteção e análise de tumores.

Neste momento, a Unilabs Portugal conta também com mais de 1000 unidades de atendimento, 10 laboratórios e realiza mais de 19,5 milhões de atos médicos por ano, assumindo-se como uma empresa líder na prestação de Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica.^{1,2}

A reputação e evolução da empresa assentam no seu forte compromisso com a saúde dos portugueses assegurado pela fiabilidade e empenho de todos os colaboradores nos

serviços prestados diariamente. Com o objetivo de estar no centro das decisões de saúde dos portugueses, a Unilabs Portugal assume como missão dar as respostas que ajudam a cuidar da saúde dos seus clientes.^{1,2}

1.2. Cancro e a Patologia oncológica

De uma forma geral, a carcinogénese é o termo utilizado para denominar um crescimento anormal e descontrolado das células. O cancro é a principal causa de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento. Entre a população portuguesa, os tumores malignos, que possuem a capacidade de metastizar, e as doenças do sistema circulatório são as principais causas de morte na idade adulta.³

A existência de fatores de risco é algo que aumenta a probabilidade de uma pessoa vir a desenvolver uma doença. O envelhecimento é um fator de risco reconhecido para a generalidade dos cancros. No entanto, fatores como a dieta alimentar, obesidade, o álcool, a exposição a agentes químicos, radiações, infeções virais e a falta de atividade física podem, também, influenciar o desenvolvimento do cancro. De facto, a incidência de cancro tem vindo a aumentar cada vez mais, como resultado do envelhecimento e crescimento populacional, bem como, cada vez mais, com a adoção de opções de estilo de vida que aumentam a sua probabilidade, como o tabagismo, o álcool, o sedentarismo e as dietas “ocidentalizadas”.⁴

Atualmente, sabe-se que existe uma relação entre o aparecimento de cancro e a informação genética do indivíduo. Esta informação genética, que está presente nos genes de um determinado indivíduo, regula o que acontece no corpo, tal como a cor dos olhos, o tipo sanguíneo, etc. Por vezes, estes genes podem sofrer alterações, designadas por mutações genéticas. Acredita-se que o desenvolvimento de uma patologia oncológica surge quando vários genes de um grupo de células sofrem mutações. Se essa mutação ocorrer nas células reprodutivas, será transmitida de pais para filhos. Caso contrário, trata-se de uma mutação somática, que ocorre apenas no indivíduo que a possui.⁵

De uma forma geral, cerca de 30 mil milhões de células normais habitam o corpo de um indivíduo saudável, interagindo entre si num complexo e interdependente processo, em que a proliferação de células é regulada por outras células. É esta colaboração entre

células que garante que cada tecido possui um tamanho e arquitetura adequados às necessidades do corpo de um indivíduo. Ou seja, de uma forma geral, o normal é que as células se reproduzam apenas quando são instruídas a fazê-lo. Contudo, as células cancerígenas, violam este esquema, deixam de reagir aos controlos habituais sobre a proliferação e seguem a sua própria estratégia de reprodução, como demonstrado na Figura 2. Estas possuem também uma propriedade ainda mais curiosa, a capacidade de migração do local onde se encontravam inicialmente, invadindo tecidos próximos e formando massas em locais distantes do corpo (Figura 2). A este fenómeno dá-se o nome de metastização. Tumores compostos por estas células malignas tornam-se cada vez mais agressivos ao longo tempo, tornando-se letais quando afectam tecidos e órgãos necessários para a sobrevivência do organismo como um todo. Atualmente, sabemos que as células de um tumor descendem de uma célula ancestral comum que, num determinado ponto - geralmente décadas antes do tumor se considerar detetável - iniciou um programa de reprodução inadequado. Esta transformação surge através da acumulação de mutações em classes específicas de genes. E são esses genes que fornecem a chave para compreender os processos que estão na base do cancro em seres humanos. ⁶

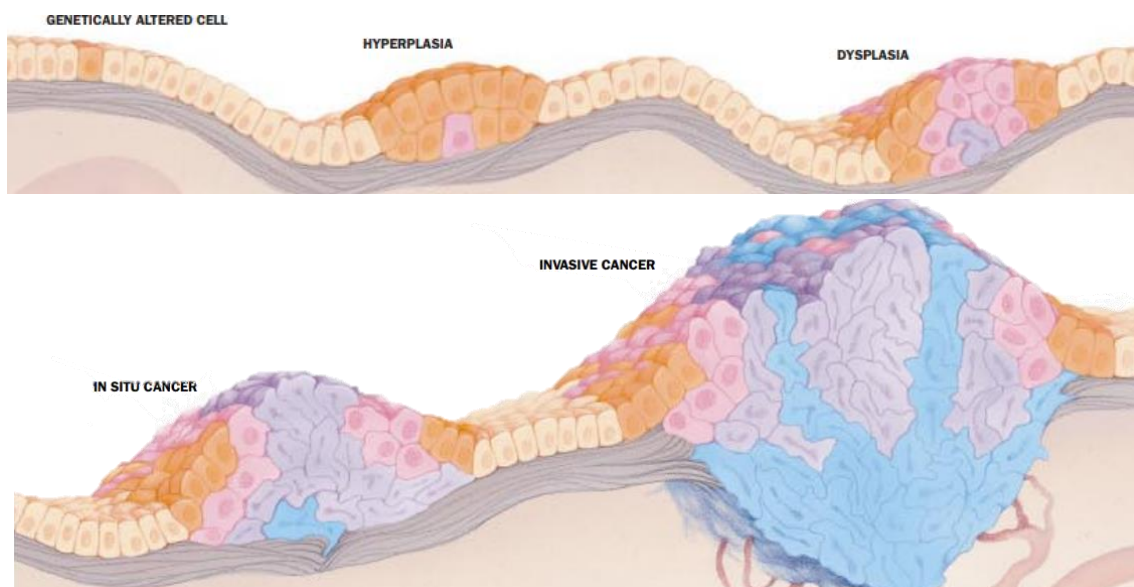


Fig. 2 – Fases de Desenvolvimento de um tumor

(Weinberg, Robert A. "How cancer arises." Scientific American 275.3 (1996): 62-70.)

A área oncológica tem sido alvo de cada vez mais estudos e investigações científicas, que culminaram na descoberta de novos dados acerca da origem desta patologia e

também de novas abordagens terapêuticas no seu tratamento. Desta forma, e estando na presença de novas descobertas e novas terapêuticas poderíamos inferir que existe uma grande possibilidade de cura quando se trata de uma patologia oncológica, o que nem sempre corresponde à realidade. Na verdade, a grande maioria dos cancros poderiam ser curados se fossem detetados de forma bastante precoce. Esta é a premissa que serve de base para a realização de exames de rastreio (como mamografias, colonoscopias, citologias, ...). Desta forma, quando os cancros são detetados precocemente, tendem a possuir menores dimensões e menor volume. Assim, são também mais fáceis de remover cirurgicamente ou mais propensos a serem eliminados em resposta à quimioterapia ou radioterapia. Contudo, muitos dos exames de rastreio referidos anteriormente apenas permitem detetar o cancro já numa fase posterior e de forma visível a nível celular. Com a implementação da tecnologia de NGS, esta veio colmatar lacunas que existiam no diagnóstico oncológico, permitindo a sua deteção quando este apenas se encontra presente a nível genético.⁷

Em suma, a deteção precoce é, por isso, frequentemente a chave para sobreviver a qualquer forma de cancro, sendo que o diagnóstico clínico, a realização de exames de rastreio e a utilização de meios complementares de diagnóstico e terapêutica desempenham um papel indispensável no sucesso do tratamento.

1.3. Sequenciação de Nova Geração

A Sequenciação de Nova Geração pode ser definida como uma tecnologia de ponta que revolucionou o estudo do genoma. Esta técnica permite, numa única experiência, a determinação de sequências de moléculas de DNA com tamanhos superiores a 1 milhão de bases (1Mbp), podendo sequenciar o genoma total de um indivíduo (*Whole Genome Sequencing*) num único dia, ou apenas regiões específicas, como certos genes. Esta técnica trouxe vantagens relativamente à técnica de Sanger, uma vez que esta apenas permite sequenciar fragmentos de DNA com um máximo de 2Kbp (Figura 3). De uma forma geral, a técnica de Sanger tem vindo a ser gradualmente substituída pela técnica de NGS, quer a nível de investigação, quer ao nível do diagnóstico clínico.⁸

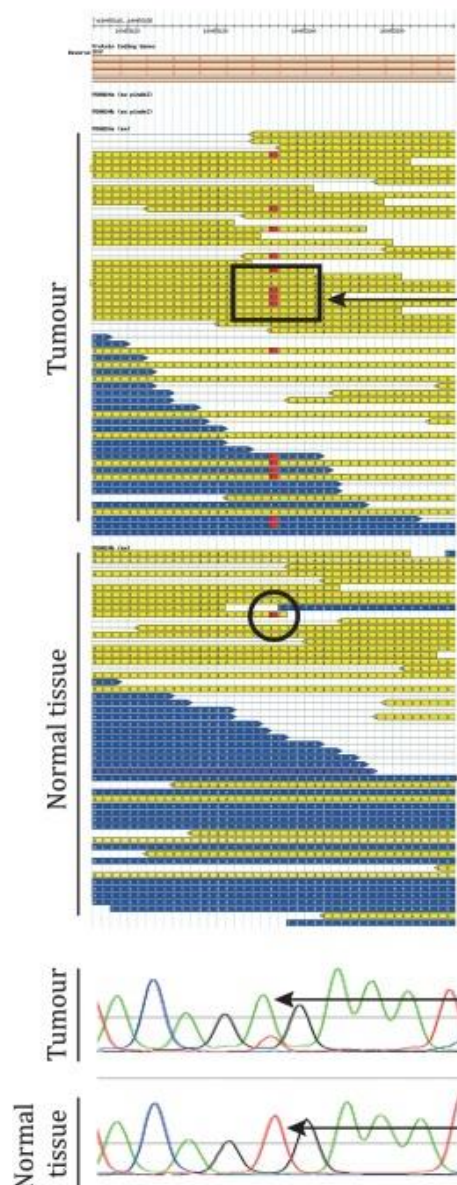


Fig. 3 – Representação esquemática dos resultados obtidos através da análise de células tumorais recorrendo à tecnologia de NGS e Sanger, respetivamente, e da sua comparação com células normais. (As setas pretas indicam o local onde ocorreu a mutação)

(Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. Archives of Disease in Childhood-Education and Practice, 98(6), 236-238.)

Existem diferentes plataformas de sequenciação de nova geração. Contudo, em todas elas ocorre a sequenciação de pequenos fragmentos de DNA em paralelo. De seguida, são utilizadas ferramentas bioinformáticas para juntar os fragmentos mapeando as leituras individuais para o genoma de referência humano. Desta forma, cada um dos

três mil milhões de bases no genoma humano é sequenciada várias vezes, fornecendo dados precisos e uma visão das variações no DNA face ao genoma de referência (Figura 3). Esta técnica pode ser utilizada para sequenciar genomas inteiros ou apenas áreas específicas de interesse, incluindo os cerca de 22.000 genes codificantes (um exoma inteiro) ou um pequeno número de genes individuais.⁹

Desde que o cancro é alvo de estudos científicos, que têm sido desenvolvidos métodos e ferramentas para que seja possível a identificação celular e molecular dos fenómenos que levam a que esta condição se estabeleça.⁹

De facto, a aplicação de tecnologias baseadas em NGS tem vindo a revolucionar a área do diagnóstico clínico da patologia oncológica, promovendo uma maior compreensão das alterações ao nível dos genes que levam a que esta condição ocorra.¹⁰

Em suma, a utilização da tecnologia NGS com base em painéis de genes permite a sequenciação simultânea de múltiplos genes, o que representa uma mais-valia devido à heterogeneidade dos genes que estão envolvidos nos diversos cancros, nomeadamente aqueles que são mais prevalentes na população portuguesa.⁸

Esta tecnologia permite ainda que sejam geradas milhões de leituras de fragmentos de DNA, com uma grande cobertura da sequência total. Todos estes fatores permitiram a classificação da metodologia NGS como uma tecnologia de alto rendimento e que apresenta um produto final preciso, com um tempo de resposta relativamente curto.⁸

Outro ponto que vale a pena salientar acerca deste método é a sua excelente relação custo-benefício, que se deve principalmente ao elevado aumento do número de amostras de DNA que é possível analisar em cada reação de sequenciação.¹¹

1.3.1 Potenciais Utilizações da Tecnologia NGS na Prática Clínica

- Genética Clínica

Existem inúmeras vantagens em utilizar a tecnologia de NGS na prática clínica tendo em vista um diagnóstico mais eficiente e que permite apresentar respostas mais precisas ao utente. A tecnologia de NGS permite analisar um espectro mais amplo de mutações do que a sequenciação de Sanger.¹²

De facto, o espectro de variações no DNA do genoma humano compreende pequenas mudanças de bases (substituições), inserções e deleções de DNA, grandes deleções genómicas de exões ou genes inteiros e rearranjos como inversões e translocações. A sequenciação tradicional de Sanger apenas permite identificar substituições e pequenas inserções e deleções. Para as restantes mutações, são realizados outro tipo de estudos, como hibridização in situ de fluorescência (FISH), o cariótipo convencional ou microarrays de hibridização genómica comparativa (CGH) com vista a detetar alterações no número de cópias cromossómicas submicroscópicas, como as microdeleções. No entanto, estes dados também podem ser obtidos diretamente a partir da sequenciação por NGS, eliminando a necessidade de vários ensaios através de técnicas diferentes, pois é possível alcançar todo o espectro de variação genómica num único ensaio. As únicas limitações desta técnica residem no facto de poderem existir regiões que foram sequenciadas ou mapeadas de forma errada devido ao conteúdo elevado de guanina/citosina (GC) ou zonas repetitivas de bases, como por exemplo, as expansões repetidas subjacentes ao síndrome de X frágil ou à doença de Huntington.¹³

A comparação entre a técnica de Sanger e NGS encontra-se representada na Figura 4. A sequenciação capilar através do método de Sanger depende do conhecimento prévio do gene ou locus sob investigação. No entanto, a técnica NGS não é seletiva e pode ser utilizada para analisar o genoma completo ou o exoma e descobrir mutações inteiramente novas e novos genes que estão na base do desenvolvimento de doenças cuja causa até então era desconhecida. Assim, esta tecnologia poderia ser utilizada para explorar e desvendar a base genética de síndromes raras e outras doenças acerca das quais ainda não existe muita informação.¹⁴

- **Oncologia**

A genómica associada ao estudo do cancro assenta na premissa de que este é causado por mutações somaticamente adquiridas. Apesar de a sequenciação através da técnica de Sanger já ser realizada há mais de uma década, estes estudos foram limitados a relativamente poucas amostras e a um pequeno número de genes analisados. Com a implementação da técnica de NGS, passou a ser possível estudar o genoma na sua totalidade. Desta forma, a sequenciação de forma individual em casos de cancro passou a permitir que fosse fornecida a base para o tratamento personalizado em oncologia. Atualmente, estão a ser desenvolvidos vários projetos-piloto utilizando a tecnologia de

NGS na prática clínica oncológica, que visam identificar mutações em tumores cujo tratamento pode passar pela utilização de fármacos específicos para essas mutações.¹⁶

1.3.2. Limitações da Tecnologia NGS

Como principais desvantagens da técnica de NGS na área clínica podemos apontar o facto de ser necessário investir em todas as infraestruturas necessárias, como a capacidade e armazenamento informáticos, e também a experiência a nível de recursos humanos necessária para analisar e interpretar de forma detalhada os dados obtidos. Para além disso, o volume de dados gerados pelos equipamentos necessita de ser analisado com recurso a plataformas e programas informáticos robustos tendo em vista a obtenção e seleção de informações clinicamente relevantes. É importante também referir que, de forma a tornar esta técnica rentável, será necessário realizar ensaios utilizando grandes lotes de amostras, o que nem sempre poderá ser possível.^{17,18}

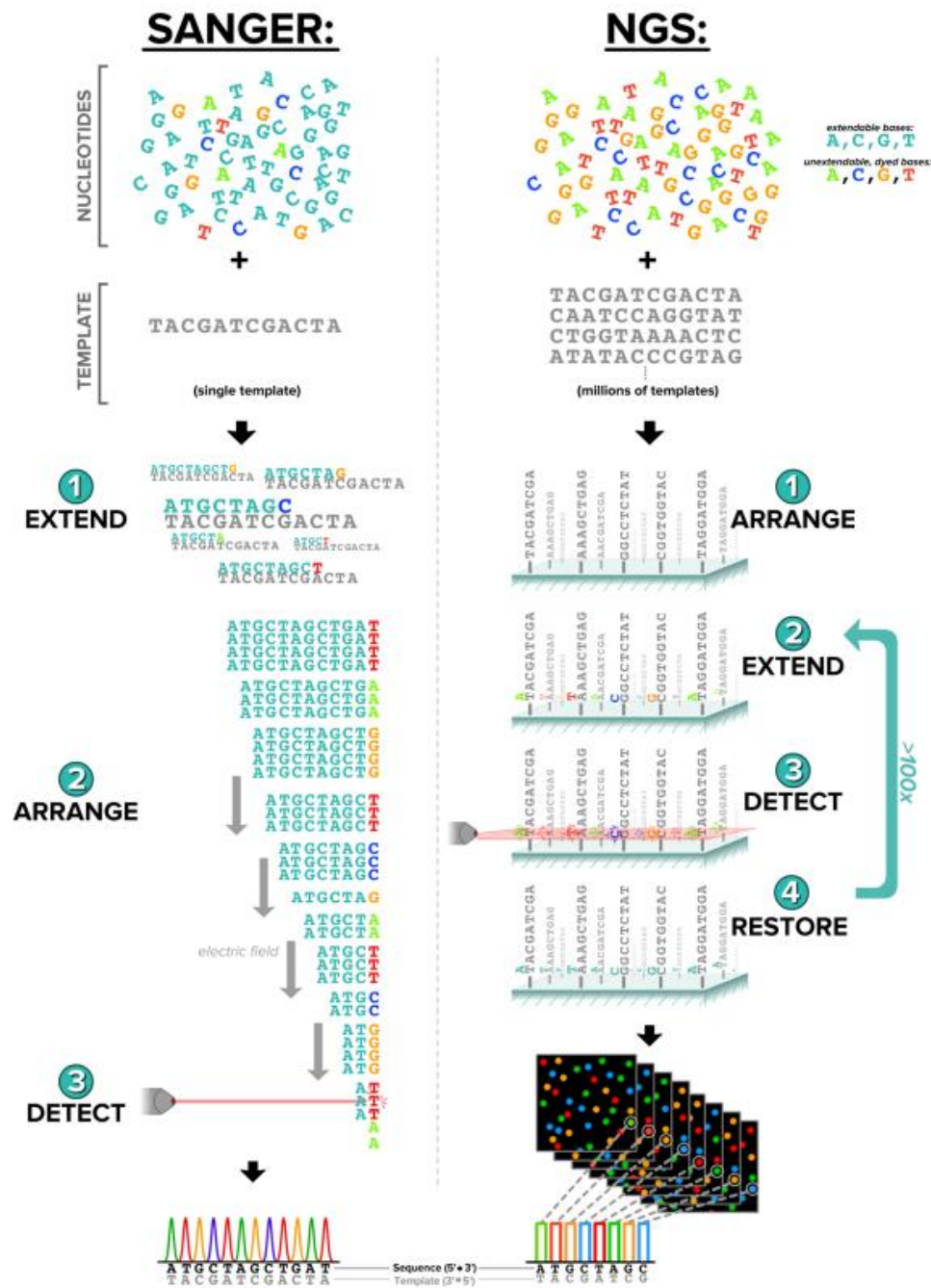


Fig. 4 – Esquema comparativo entre a técnica de Sanger e NGS

(Behjati, Sam, and Patrick S. Tarpey. "What is next generation sequencing?." Archives of Disease in Childhood-Education and Practice 98.6 (2013): 236-238)

1.4. Objetivos do Trabalho

A tecnologia de NGS tem permitido cada vez mais avanços na investigação e diagnóstico clínico, sendo cada vez mais importante neste setor, pois possibilita a obtenção de resultados fiáveis e específicos no menor tempo possível. Tendo por base esta premissa torna-se fundamental a aquisição e atualização dos equipamentos de NGS existentes, assim como a implementação de novos procedimentos laboratoriais ajustados a estes equipamentos. Assim, os objetivos primordiais deste projeto prendem-se com a aquisição de um novo equipamento de NGS, possibilitando a otimização e automatização dos procedimentos laboratoriais existentes, assim como a elaboração de processos e procedimentos para implementação do novo equipamento, a realização de um estudo de viabilidade do novo processo laboratorial no mercado atual e custos associados, a elaboração e implementação de um novo processo de diagnóstico laboratorial de NGS com recurso a know-how técnico e a compreensão da importância da utilização da metodologia NGS em contexto empresarial, com vista ao diagnóstico clínico.

2. Implementação do Método

Com vista à resolução do problema inicialmente proposto, que tem por base a aquisição de um equipamento de sequenciação de nova geração e o desenvolvimento do seu protocolo de aplicação laboratorial, foi selecionado o equipamento *Genexus System*. A escolha deste equipamento, por parte da equipa técnica e de gestão, recaiu, sobretudo, nas suas principais funcionalidades, nas aplicações que permite no campo do diagnóstico clínico e nas principais vantagens que oferece face a outros equipamentos já existentes no mercado.

Ao longo deste capítulo estará presente a descrição do equipamento e das suas aplicações, assim como o protocolo de utilização associado ao mesmo.

2.1. Genexus System

Genexus (Figura 5) é o nome comercial de um equipamento que incorpora a tecnologia de NGS (*Next Generation Sequencing*) e que automatiza o fluxo de trabalho desde a introdução da amostra até à obtenção do relatório final, podendo gerar resultados em um só dia, com apenas dois momentos de contacto com o utilizador, como representado

na Figura 6. No anexo 1 encontra-se representado o *flyer* que resume todas as funcionalidades do equipamento em questão.

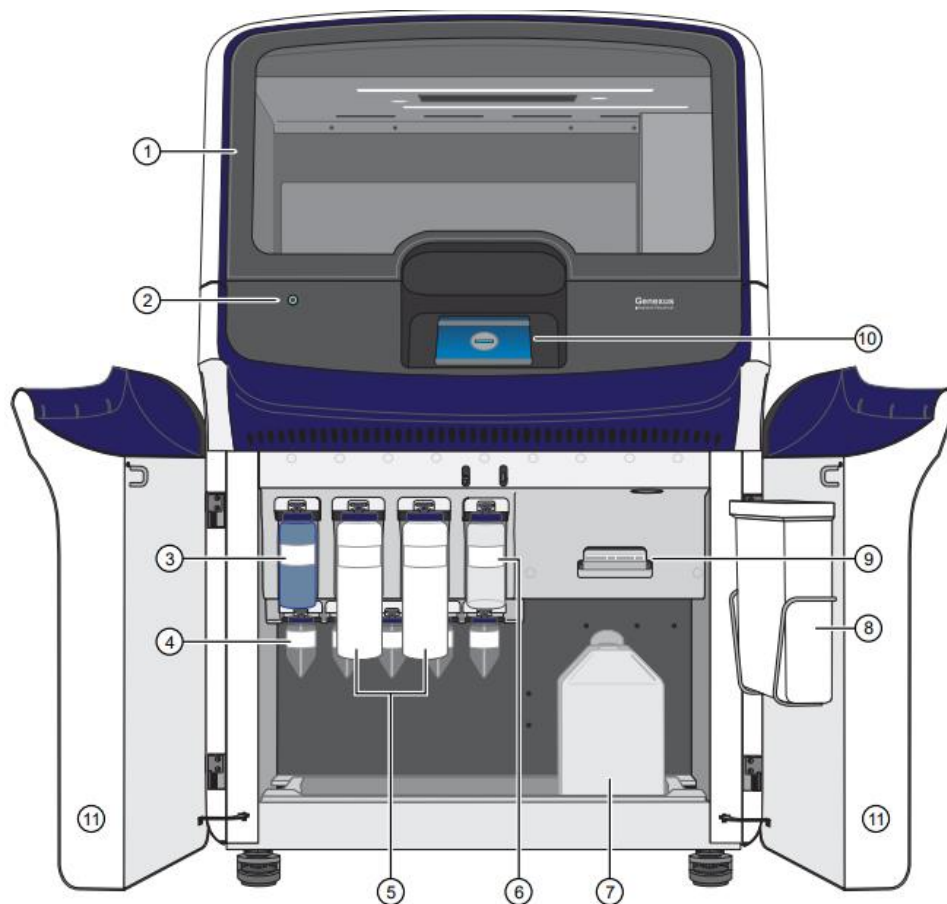


Fig. 5 – Representação esquemática do equipamento *Genexus* (*Genexus Integrated Sequencer Manual*, Thermo Fisher Website)

(1. Porta, 2. Botão de iniciação, 3. Garrafa 1 – Resíduos químicos, 4. Garrafas Cónicas, 5. Garrafa 2 – Solução de Sequenciação, 6. Garrafa 3 – Solução de Limpeza, 7. Contentor de resíduos, 8. Resíduos de pontas de pipetas, 9. Cartridge, 10. Ecrã Tátil, 11. Porta para acesso a reagentes de sequenciação)

Este sistema é altamente flexível, uma vez que permite que um baixo número de amostras sejam processadas (mesmo que seja apenas uma) de maneira económica, pois otimiza os gastos. Este é também um equipamento com uma experiência para o utilizador simples e prática que torna mais fácil a sua utilização e implementação na

investigação clínica ou laboratórios de análises, independentemente do nível atual de experiência da equipa de laboratório em NGS.¹⁹

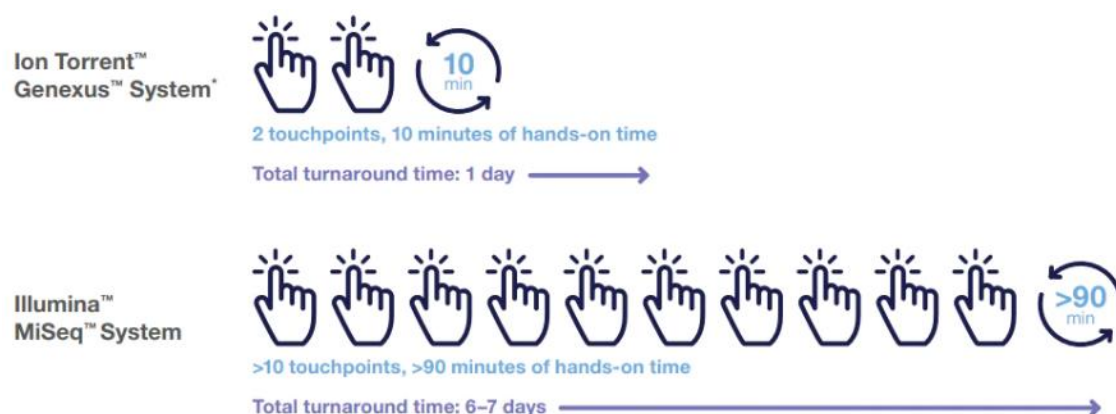


Fig. 6 – Comparação entre o Sistema de Sequenciação Genexus e um sistema de sequenciação convencional (*The Genexus System—the future of NGS is here*, Flyer, Thermo Fisher Website)

De uma forma geral, o equipamento Genexus consiste num sistema de purificação com um sequenciador integrado, de forma a combinar e automatizar a extração e purificação de ácidos nucleicos, a preparação da biblioteca de dados, sequenciação e relatórios de análise, num único software (Figura 7). Estas funcionalidades permitem reduzir o número de instrumentos e consumíveis necessários, assim como o tempo necessário para a realização da técnica, aumentando a eficiência geral do trabalho laboratorial.²⁰

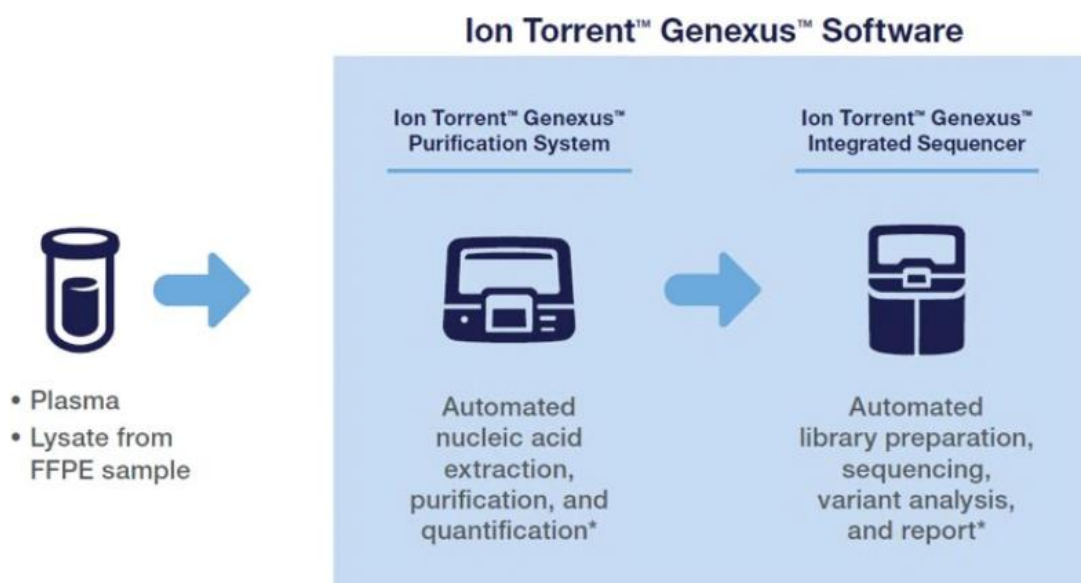


Fig. 7 – Representação esquemática do procedimento efetuado pelo sistema Genexus

(Rapid and Accurate Variant Calling of FFPE Samples with the Genexus System, Thermo Fisher Website)

Assim, o facto de apenas existirem 2 pontos ao longo do processo em que é necessária a intervenção do utilizador, permite reduzir a variabilidade introduzida por diferentes utilizadores, aumentando a reprodutibilidade dos resultados nos vários ensaios.²⁰

Para além disso, podem ser realizados vários ensaios simultaneamente pela mesma versão do software, permitindo que os utilizadores retenham os planos de trabalho previamente implementados enquanto otimizam novos ensaios. De facto, esta é uma das principais vantagens que podemos apontar a este equipamento, pois desta forma, as atualizações do software são também menos frequentes, visto que os novos tipos de ensaios podem ser definidos de forma independente dos existentes naquele momento. Desta forma, o software do sistema *Genexus* oferece aos utilizadores a flexibilidade de otimizar um novo ensaio enquanto outro ensaio é executado. Assim, o equipamento permite efetuar uma redução dos custos de operação e maior rapidez de resposta, aumentando a eficácia de todo o processo. Isto deve-se sobretudo à análise bioinformática, em que é utilizado o software associado ao equipamento *Genexus*.^{20,21}

De um modo geral, a utilização do software é bastante *user-friendly*, desde a programação do ensaio até à emissão do relatório. Na Figura 8, podemos observar o exemplo de um *output* emitido pelo equipamento e que se encontra disponível na página web da ThermoFisher Scientific™.

example

Labs

Example Health System

123 Street

City, State USA 000000

Tel +1 000-000-0000

email@examplehealth.com

www.examplehealth.com

Sample information

Case Number:

00-123456789

Sample Collected:

07/30/2020

Sample Cancer Type: Non-Small Cell Lung Cancer

Relevant Non-Small Cell Lung Cancer Findings

Gene	Finding	Gene	Finding
ALK	Not detected	NRAS	Not detected
BRAF	Not detected	NTRK1	Not detected
EGFR	EGFR exon 19 deletion	NTRK2	Not detected
ERBB2	Not detected	NTRK3	Not detected
KRAS	Not detected	RET	Not detected
MET	Not detected	ROS1	Not detected

Relevant Biomarkers

Tier	Genomic Alteration	Annotations
1A	EGFR exon 19 deletion	

Fig. 8 – Representação de um relatório emitido pelo sistema Genexus

(Thermo Fisher Website)

Em suma, podemos apontar como principais vantagens do sistema Genexus, o facto de este permitir chegar rapidamente ao relatório final a partir da amostra num só dia, de simplificar o fluxo de trabalho automatizando todos os passos necessários desde a preparação da amostra até à análise e interpretação dos resultados, de possibilitar a modulação da configuração da execução conforme o número de amostras, com a flexibilidade de realizar em simultâneo até 32 reações diferentes da biblioteca por cada execução, o facto de reduzir os custos de utilização da tecnologia NGS, utilizando uma configuração automática simplificada, com dois únicos pontos de contacto com o utilizador e dez minutos de tempo total de operação em que este é necessário, e por fim por permitir a prevenção de erros do utilizador, pois o sistema incorporado no sequenciador Genexus verifica a colocação de reagentes e deteta erros em tempo real.

22

Por outro lado, relativamente às desvantagens desta tecnologia podemos referir os custos de manutenção, avarias e também o investimento inicial bastante elevado, a rondar os 300 000 €.

Relativamente às possíveis aplicações no mercado deste equipamento, este destina-se sobretudo à identificação de patologias oncológicas, que se enquadra no objetivo deste

projeto. Contudo, também é possível recorrer a este equipamento para a deteção de estirpes de vírus (como por exemplo o SARS Cov-2), realizar testes específicos para doenças raras hereditárias associadas a um determinado gene ou a vários genes e ainda a realização de testes de confirmação de análises moleculares em larga escala para as hepatites B e C e para o HIV, como representado na Figura 9.²³

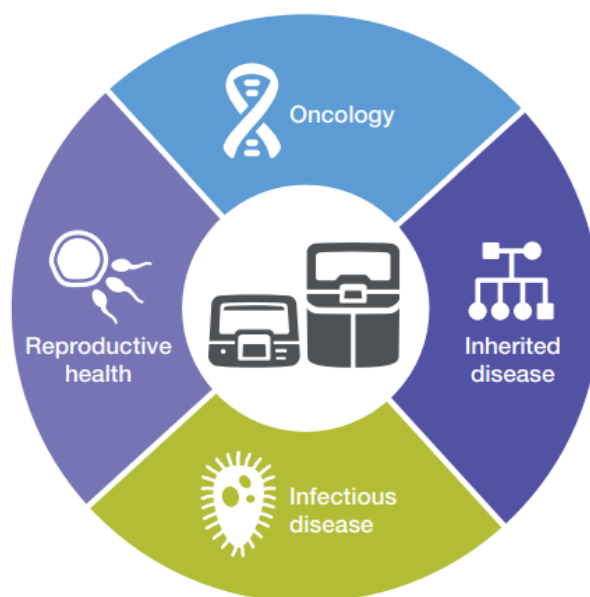


Fig. 9 – Aplicações Gerais do Sistema Genexus no mercado (*Genexus Brochure*, Thermo Fisher website)

Para que a identificação de patologias oncológicas ocorra, este tipo de teste de diagnóstico poderá ser solicitado por médicos de unidades de saúde e especialistas externos em genética médica, em programas de aconselhamento genético relativo à genética preditiva e preventiva e para confirmação de diagnósticos.²⁴

Assim, a abordagem deste equipamento será sobretudo numa vertente B2B (*Business to Business*), uma vez que os principais clientes deste tipo de testes serão hospitais, clínicas, etc. e não o consumidor final.

2.2. Tecnologia Ion Torrent

O Sistema Genexus caracteriza-se pela utilização da tecnologia de sequenciação Ion Torrent. Este tipo de sequenciação, mediada por chips semicondutores e

comercializada pela Thermo Fisher Scientific, é considerada uma tecnologia relativamente recente.

Nesta tecnologia, o procedimento de preparação do DNA inicia-se com a sua fragmentação e com a ligação de adaptadores. Os fragmentos são então ligados a beads e amplificados numa reação de PCR. De seguida, a biblioteca que contém os fragmentos com os adaptadores é então “carregada” no chip de sequenciação. A cada ciclo no sequenciador, uma base é adicionada pelo equipamento no interior do chip.²⁵

Como referido anteriormente, esta técnica de sequenciação é realizada em chips. Estes possuem na sua superfície micro-sensores de pH, que detetam o processo de amplificação do DNA. Através da deteção de alterações de pH provocadas pela libertação de iões de hidrogénio (H⁺), ocorridas durante a polimerização do DNA e incorporação de bases, o sistema Ion Torrent é capaz de determinar a sequência da molécula em estudo, transformando o sinal químico em sinal digital. A simplicidade do sistema, que elimina a necessidade de utilização de nucleotídeos modificados, de lasers, scanners e câmeras, garante uma alta exatidão do sistema. Este sistema garante ainda uma cobertura homogénea da sequência em estudo, até mesmo em regiões mais desafiantes, como regiões ricas em conteúdo GC e regiões de homopolímeros.²⁶

De uma forma geral, esta tecnologia de sequenciação tem sido utilizada, sobretudo, por hospitais e outras instituições clínicas para sequenciar genes de amostras de tumores de pacientes, tendo em vista a pesquisa de mutações que possam dar indícios de quais as terapêuticas que poderão funcionar melhor.

2.3. Painéis Somáticos de Cancro

A maioria dos cancros tem como origem mutações somáticas. Algumas mutações comuns no mesmo tipo de cancro podem formar uma espécie de “assinatura” para prever especificamente o prognóstico ou para distingui-lo de outros cancros.

Atualmente, com o avanço das tecnologias de sequenciação, melhorou-se a capacidade para detetar mutações germinativas e somáticas num curto período de tempo. Tais progressos devem-se à chegada da técnica já anteriormente referida como sequenciação de nova geração e que tem vindo gradualmente a substituir a sequenciação de Sanger. Este avanço tem permitido a sequenciação de cada vez mais

mutações em diferentes genes utilizando a tecnologia de NGS e recorrendo a painéis de genes, com um custo cada vez menor.²⁷

Com a rápida introdução clínica dos painéis de genes levantaram-se algumas questões. Um dos aspetos mais importantes a ter em conta na inclusão de genes num painel genético é a relevância clínica dos mesmos (se possuem ou não possuem patogenicidade associada às variantes detetadas), pois a utilidade do teste diminui quando não podemos associar estas alterações a um significado clínico.²⁸

Ter o cuidado de fazer uma inclusão de genes com elevada especificidade aumenta a utilidade do teste, incluindo genes que comprovadamente exercem um papel importante na oncogénese do tipo de cancro em análise e que permitem com alguma segurança dar orientações precisas para os pacientes, quer seja a nível preventivo ou terapêutico.

29

2.4. Procedimentos Laboratoriais

É importante salientar que por motivos de confidencialidade empresarial, este relatório de estágio não especificará todos os procedimentos descritos, nem todos os materiais e recursos utilizados nos mesmos.

O procedimento para utilização do equipamento *Genexus* tem como objetivo a análise de materiais biológicos provenientes de biópsias nas quais está indicada a pesquisa de mutações genéticas associadas ao desenvolvimento de cancro. Estas amostras serão inicialmente processadas no LAP – Laboratório de Anatomia Patológica, um laboratório também pertencente ao grupo Unilabs, e de seguida serão encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular, para que seja realizada a sua análise por NGS, recorrendo ao sistema *Genexus*.

2.4.1 Procedimentos Laboratoriais no LAP – Laboratório de Anatomia Patológica

Neste ponto será brevemente descrito o procedimento prévio à análise de NGS, realizado no LAP.

Receção das peças e processamento administrativo/pré-analítico

No início de cada dia, as peças de órgãos/biópsias chegam ao LAP. Aquando da sua chegada, é verificado se estas estão preservadas em formol (fixador).

De seguida, na secção administrativa, é atribuído a cada peça recebida um código alfanumérico interno e a informação e historial clínico do paciente é inserida no sistema informático, de forma a que esta esteja acessível a todos.

Análise Macroscópica das Peças/Biópsia e Corte

Após o processamento administrativo, o técnico(a) de anatomia patológica analisa o material proveniente das biópsias, ressaltando os aspetos macroscópicos da peça anatómica, como a cor, o tamanho e aparência geral do órgão/biópsia analisado. De seguida, o técnico procede ao corte do material.

Processamento

O princípio do processamento histológico consiste na difusão de reagentes para o interior dos tecidos e na remoção do líquido tecidual. O processamento tecidual também torna os fragmentos rígidos capazes de proporcionar o seu seccionamento ultrafino para a observação ao microscópio.

Diversas substâncias podem ser utilizadas como meio de inclusão, porém, no processamento convencional, normalmente utiliza-se a parafina.

Inclusão em parafina e Microtomia

A inclusão consiste em colocar, com o auxílio de uma pinça, os tecidos no interior de um molde que contém parafina líquida.

Para permitir a análise dos tecidos ao microscópio de luz, estes devem ser seccionados em cortes bem finos e uniformes. O equipamento utilizado para efetuar cortes com tal precisão é o micrótomo. Após o corte, estes são transferidos para uma lâmina limpa e adesivada e colocados numa estufa para aumentar a aderência do corte à lâmina.



Fig. 10 – Micrótopo

(Alpha Omega Eletronics Website)

Coloração

A utilização de corantes é fundamental para visualizar os tecidos ao microscópio de luz. Após a microtomia, as células e o material extracelular são habitualmente transparentes e os corantes melhoram a visualização das estruturas teciduais.

Digitalização das lâminas

De seguida ocorre a digitalização das lâminas, para que a sua visualização seja possível em formato digital.

Análise pelo médico patologista

Deteção, identificação e descrição da zona tumoral

Envio das amostras relevantes para o laboratório de Biologia Molecular

De uma forma geral, as amostras que sejam consideradas relevantes para o estudo de sequenciação no laboratório de Biologia Molecular, devem ser enviadas sob a forma de cortes de tecido tumoral incluído em parafina e fixado com formol tamponado a 10 %.

Relativamente aos estudos de mutações para análise por NGS, o envio deverá conter 4 lâminas com cortes colados de 5 micron, e uma lâmina de H&E, com indicação da percentagem tumoral, e com a zona tumoral devidamente assinalada por um patologista.

2.4.2 Procedimento para Utilização do Equipamento Genexus

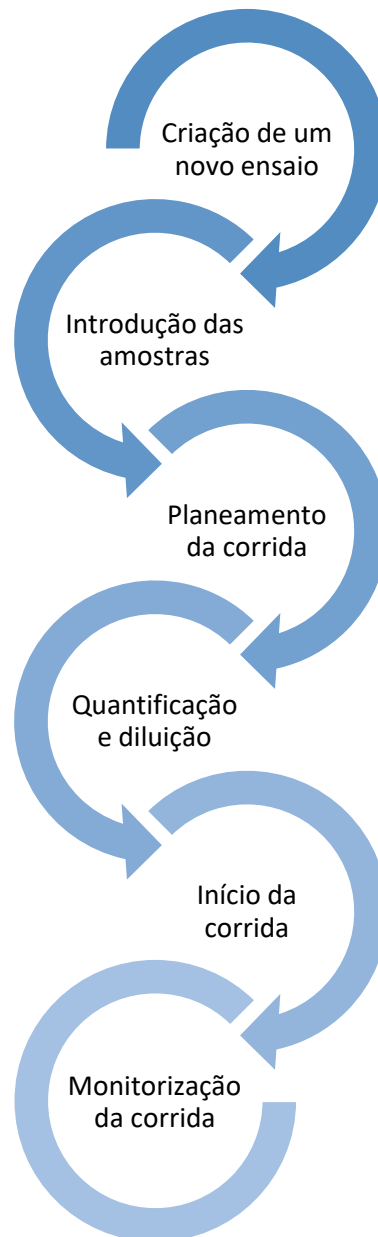


Fig. 11 – Esquematização do procedimento para utilização do equipamento

Para a utilização do equipamento Genexus, o procedimento inclui diversos passos (Figura 11) que serão descritos ao longo deste ponto.

Após toda a configuração e instalação do equipamento, para proceder à análise de uma amostra, o primeiro passo deverá ser a criação de um novo ensaio. Para isso, poderão ser utilizados os ensaios que o sistema já apresenta como pré-definidos, ou em alternativa, o utilizador poderá optar pela personalização do ensaio, seleccionando e definindo os parâmetros de acordo com o ensaio que pretende realizar. De seguida,

procede-se à introdução das amostras que se pretende que sejam analisadas no equipamento, realiza-se a sua identificação e também o preenchimento de diversas informações acerca das mesmas, tais como a data de colheita da amostra, género do paciente, o tipo de amostra e qual o painel de genes / patologia que se pretende estudar. Seguidamente, efetua-se o planeamento da corrida, recorrendo ao software *Genexus*, que contém todas as definições relativas à preparação da biblioteca, análise e sequenciação, que necessitam de ser ajustadas. Assim como as informações acerca das amostras, tais como a sua localização na placa, o planeamento do ensaio e também os códigos de barras, associados a cada elemento/reagente do equipamento.

Após a extração de ácidos nucleicos recorrendo a um kit de extração automático e tendo em vista a introdução das amostras no equipamento, procede-se à sua quantificação e diluição, de acordo com a concentração pretendida. Posteriormente, e após a introdução das amostras e de todos os consumíveis necessários no equipamento *Genexus* (Figura 12), inicia-se a corrida. Em seguida, é apenas necessário monitorizar a corrida em tempo real através do software integrado e por fim, rever e verificar os dados emitidos pelo software e proceder à análise de resultados. Para esta análise é utilizado o programa informático *Oncomine Precision Assay*, um software que associa as mutações encontradas a artigos científicos que apresentam estudos e terapêuticas relevantes que já foram testadas e utilizadas para cada uma das mutações.

Com o objetivo de testar e validar o equipamento, foi realizado um ensaio-piloto que seguiu todos os passos aqui descritos. Para este ensaio foram selecionadas várias amostras de células de pacientes com cancro do pulmão e foi analisado um painel de genes relevantes para o tipo de cancro em estudo. Este painel incluiu os genes ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS, MET, NTRK1, NTRK2, NTRK3, RET e ROS1.

Neste ensaio foram também testados diferentes kits de extração de DNA, tal como o kit fornecido pela Thermo Fisher™ e o kit fornecido pela Promega™.



Fig. 12 – Carregamento do Equipamento *Genexus*

(Thermo Fisher Website)

3. Resultados/Discussão

3.1. Análise de custos resultantes da instalação, utilização do equipamento e investimento inicial

O objetivo deste subcapítulo prende-se com o cálculo do custo total da realização da técnica de NGS, utilizando o equipamento *Genexus*, na realização de testes de diagnóstico de cancros de linhas somáticas.

Desta forma, o custo total de produção foi estimado recorrendo a um método de *micro-costing*, utilizando informações fornecidas pela empresa que comercializa o equipamento e dados recolhidos no laboratório. De uma forma geral, os custos foram divididos de acordo com a etapa do processo (desde a fase pré-analítica até à emissão do relatório final) e também de acordo com o tipo de custos que representam (consumíveis, mão-de-obra, equipamento, manutenção, repetições/confirmações e custos indiretos). Assim, as etapas do processo incluíram a fase pré-analítica (receção de amostras e a extração de DNA), a preparação de bibliotecas, a sequenciação, a análise bioinformática e a validação final. Relativamente aos custos de mão-de-obra, estes foram calculados de acordo com o tempo necessário para a realização de cada

uma das tarefas inerentes a este procedimento e tendo em conta a categoria do profissional que o realiza.

Por motivos de confidencialidade empresarial, os valores obtidos não poderão ser apresentados. No Anexo 2 encontra-se representada a tabela utilizada para o cálculo dos custos referidos anteriormente.

Assim, tendo em conta os parâmetros considerados e analisados, foi possível confirmar que a aquisição e a implementação de estudos de sequenciação por NGS recorrendo ao equipamento *Genexus* permitiu à empresa reduzir os custos face ao serviço de subcontratação ao qual recorria. Esta redução de custos, deve-se sobretudo à eliminação da taxa de lucro aplicada pela empresa subcontratada, assim como outros custos relacionados com burocracias e protocolos. Esta mudança permitirá à empresa ser mais eficiente economicamente e também diminuir o tempo de resposta aos utentes.

3.2. Ensaio-piloto

Com o objetivo de testar e validar o equipamento, foi realizado um ensaio-piloto que seguiu todos os passos indicados ao longo do capítulo de implementação do método. Para este ensaio foram selecionadas várias amostras de células de pacientes com cancro do pulmão e foi analisado um painel de genes relevantes para o tipo de cancro em estudo. Foi também validado o kit de extração utilizando kits provenientes de fornecedores diferentes.

3.2.1. Validação do Kit de Extração

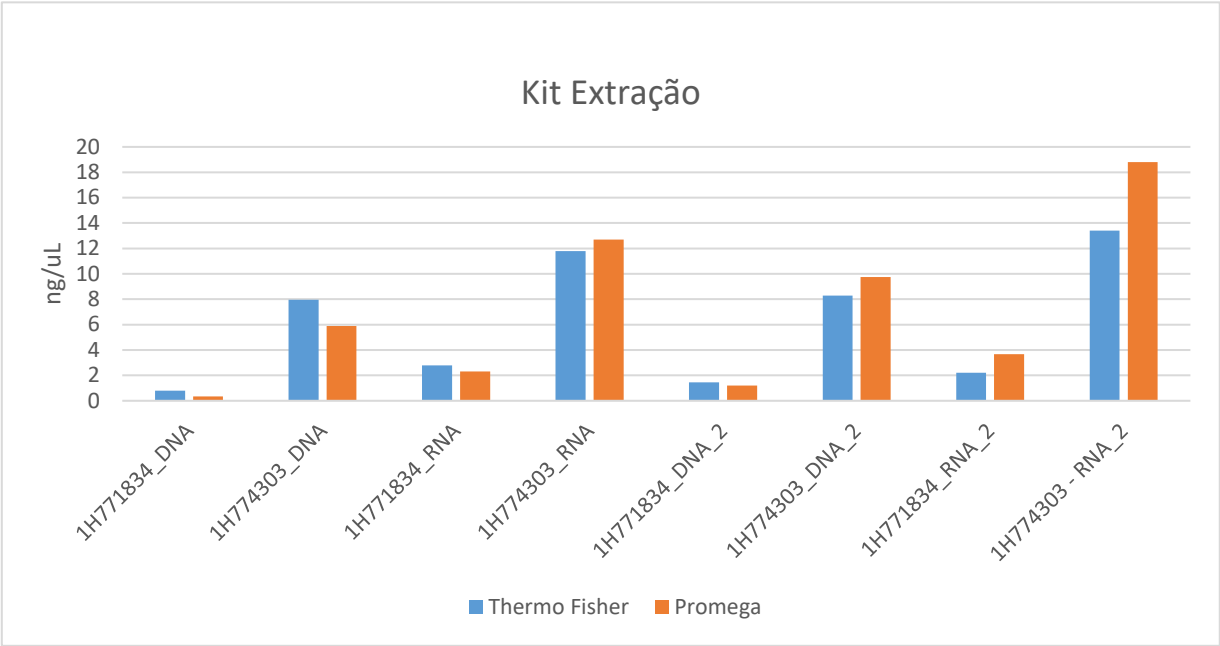
Tendo em vista a validação do kit de extração de ácidos nucleicos foram testados dois kits de extração automática de DNA. Um deles comercializado pela Promega™ e outro pela Thermo Fisher Scientific™. Utilizando amostras de dois pacientes, foram extraídos DNA e RNA, utilizando os diferentes kits. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 1 e no Gráfico 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos utilizando diferentes kits de extração

Número Amostra	Ácido Nucleico	Kit Extração	Identificação Paciente	Concentração (ng/μl)
1	DNA	Thermo	1H771834	0,8
2		Fisher	1H774303	7,96
3		Promega	1H771834	0,338
4			1H774303	5,88
5	RNA	Thermo	1H771834	2,8
6		Fisher	1H774303	11,8
7		Promega	1H771834	2,31
8			1H774303	12,7
9	DNA	Thermo	1H771834	1,44
10		Fisher	1H774303	8,28
11		Promega	1H771834	1,19
12			1H774303	9,76
13	RNA	Thermo	1H771834	2,22
14		Fisher	1H774303	13,4
15		Promega	1H771834	3,67
16			1H774303	18,8

De uma forma geral, em certas amostras foram obtidos melhores resultados com o kit da Promega™ e noutras amostras com o kit da Thermo Fisher™, o que não permite tirar uma conclusão objetiva. Contudo, é importante salientar que, nas amostras em que o kit da Promega™ apresentou melhores resultados, os valores da concentração das amostras tendem a ser bastante mais elevados, do que quando o contrário ocorre. Isto pode dever-se ao facto de o kit Promega™ ser específico para extração de ácidos nucleicos em amostras FFPE, ou seja, amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, que é o caso das amostras utilizadas. Desta forma, em ensaios posteriores será priorizada a utilização do kit de extração da Promega™, com o objetivo de obter os melhores resultados possíveis durante a extração de ácidos nucleicos.

Gráfico 1 - Resultados obtidos utilizando diferentes kits de extração



3.2.2. Validação dos Resultados Obtidos

Como já foi referido anteriormente, foram seleccionadas várias amostras de tecidos de pacientes com cancro do pulmão e foi analisado um painel de genes relevantes para o tipo de cancro em estudo. Este painel incluiu os genes representados na primeira coluna da Tabela 2.

Tabela 2- Resultados obtidos através da tecnologia de NGS pelo laboratório independente

Gene	Resultado
ALK	Não detetado
BRAF	Não detetado
EGFR	Amplificação
ERBB2	Não detetado
KRAS	Não detetado
MET	Amplificação
NTRK1	Não detetado
NTRK2	Não detetado
NTRK3	Não detetado
RET	Não detetado
ROS1	Não detetado

Para a validação dos resultados obtidos, as amostras testadas no laboratório de Biologia Molecular da Unilabs, foram também testadas através da tecnologia NGS utilizando o mesmo painel de genes por um laboratório independente, para comparação de resultados e validação do equipamento. Os resultados obtidos por este laboratório para a amostra 2H16141-2 encontram-se representados na Tabela 2.

No ensaio-piloto, realizado nas instalações da Unilabs, e cujos resultados obtidos relativamente à amostra 2H16141-2 estão representados na Figura 13, foi detetada amplificação dos genes EGFR e MET. Desta forma, o resultado obtido no ensaio com o painel *Oncomine Precision Assay* é concordante com o resultado obtido no laboratório independente, no qual foi utilizado o painel *Oncomine Focus Assay*, e em que foi detetada a variante c.2573T>G p.(Leu858Arg) no gene EGFR, com a mesma frequência alélica nos dois resultados (55%). Foi também detetada a amplificação deste gene com 5 cópias e a amplificação do gene MET com a mesma frequência alélica nos dois resultados (10%). Assim, os resultados coincidem com os resultados obtidos pelo laboratório independente, o que permite comprovar a reprodutibilidade dos ensaios e validar o equipamento. Futuras abordagens poderão incluir a utilização de outros painéis de genes e a realização do mesmo ensaio por diferentes pessoas e em dias diferentes, o que poderá reforçar a eficácia e a robustez dos resultados obtidos pelo equipamento em questão.

Sample Cancer Type: Non-Small Cell Lung Cancer

Relevant Non-Small Cell Lung Cancer Findings

Gene	Finding	Gene	Finding
ALK	None detected	NTRK1	None detected
BRAF	None detected	NTRK2	None detected
EGFR	EGFR L858R, EGFR amplification	NTRK3	None detected
ERBB2	None detected	RET	None detected
KRAS	None detected	ROS1	None detected
MET	MET amplification		

Fig. 13 – Resultados obtidos através da utilização do equipamento *Genexus*

De uma forma geral, os relatórios gerados pelo equipamento *Genexus* indicam quais os genes amplificados e qual a terapêutica(s) mais indicada(s) para cada alteração, à luz da evidência científica atual. Os resultados obtidos para este ensaio-piloto encontram-se representados na Figura 14. Para complementar esta informação, são também apresentadas no relatório as referências dos artigos científicos que sustentam estas

terapêuticas, assim como o número de ensaios clínicos já realizados. É também importante referir que o ensaio-piloto realizado e a comparação de resultados obtidos devem ser novamente repetidos no período máximo de 1 ano, uma vez que podem ser encontradas novas terapêuticas para mutações que até então não as possuíam.

Relevant Biomarkers

Genomic Alteration	Relevant Therapies (In this cancer type)	Relevant Therapies (In other cancer type)	Clinical Trials
EGFR L858R Allele Frequency: 53.41%	afatinib ^{1,2} bevacizumab* + erlotinib ¹ dacomitinib ^{1,2} erlotinib ^{1,2} erlotinib + ramucirumab ^{1,2} gefitinib* ^{1,2} osimertinib ^{1,2} atezolizumab + bevacizumab + chemotherapy bevacizumab + gefitinib gefitinib + chemotherapy osimertinib + chemotherapy	None	214
MET amplification	capmatinib crizotinib tepotinib	None	33
TP53 R249S Allele Frequency: 62.10%	None	None	14
FGFR3 amplification	None	None	13
EGFR amplification	None	None	12
CDKN2A deletion	None	None	6

Public data sources included in relevant therapies: EMA¹, FDA², ESMO, NCCN
* Includes biosimilars

Figura 14 - Relatório emitido pelo equipamento *Genexus*, indicando as terapêuticas mais adequadas para cada uma das mutações encontradas

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

De uma forma geral, os objetivos propostos no início deste projeto foram atingidos. Tendo em conta todos os resultados obtidos no âmbito deste trabalho, é possível afirmar que a aquisição e implementação de um equipamento que permitisse a análise de alterações somáticas recorrendo à tecnologia de NGS foi alcançada com sucesso. Tendo como ponto de partida a pesquisa realizada previamente, foi selecionado o equipamento *Genexus*, que permitiu colmatar a necessidade existente na empresa em questão. Foram também definidos, testados e implementados com sucesso fluxos de receção, preparação das amostras e de utilização do equipamento.

Assim, os dados obtidos e a pesquisa realizada ao longo deste projeto permitem inferir que o equipamento *Genexus* foi testado e é capaz de identificar alterações somáticas, fornecendo um relatório que incluiu não só os genes em que foram detetadas mutações, mas também artigos científicos atualizados que apresentam as terapêuticas mais adequadas a cada mutação encontrada. Desta forma, este trabalho assume-se como o ponto de partida para que outros projetos mais detalhados sejam desenvolvidos tendo em vista a aquisição de mais conhecimento acerca de outras funcionalidades e também das limitações do equipamento. Futuros estudos poderão incluir a utilização de amostras de células cancerígenas de outro tipo de patologias oncológicas, tais como, o cancro colorretal, entre outros.

5. Referências Bibliográficas

1. Wikipedia, (<https://de.wikipedia.org/wiki/Unilabs>);
2. Unilabs Website, (<https://unilabs.com/our-company/about-unilabs/who-we-are>, <https://www.unilabs.pt/unilabs/sobre-n%C3%B3s>)
3. World Health Organization. (2008). *The global burden of disease: 2004 update*. World Health Organization.
4. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2008). GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*.
5. Hausman, D. M. (2019). What is cancer?. *Perspectives in biology and medicine*, 62(4), 778-784.
6. Bailar, J. C., & Gornik, H. L. (1997). Cancer undefeated. *New England Journal of Medicine*, 336(22), 1569-1574.
7. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
8. Reis-Filho, J. S. (2009). Next-generation sequencing. *Breast cancer research*, 11(3), 1-7.
9. Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 98(6), 236-238.
10. Raje, N., Soden, S., Swanson, D., Ciaccio, C. E., Kingsmore, S. F., & Dinwiddie, D. L. (2014). Utility of next generation sequencing in clinical primary immunodeficiencies. *Current allergy and asthma reports*, 14(10), 1-13.
11. Stoddard, J. L., Niemela, J. E., Fleisher, T. A., & Rosenzweig, S. D. (2014). Targeted NGS: a cost-effective approach to molecular diagnosis of PIDs. *Frontiers in immunology*, 5, 531.
12. Sabour, L., Sabour, M., & Ghorbian, S. (2017). Clinical applications of next-generation sequencing in cancer diagnosis. *Pathology & Oncology Research*, 23(2), 225-234.
13. Shen, T., Pajaro-Van de Stadt, S. H., Yeat, N. C., & Lin, J. C. H. (2015). Clinical applications of next generation sequencing in cancer: from panels, to exomes, to genomes. *Frontiers in genetics*, 6, 215.
14. Sikkema-Raddatz, B., Johansson, L. F., de Boer, E. N., Almomani, R., Boven, L. G., van den Berg, M. P., ... & Sinke, R. J. (2013). Targeted next-generation

- sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Human mutation*, 34(7), 1035-1042.
15. Deurenberg, R. H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M. A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., ... & Rossen, J. W. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of biotechnology*, 243, 16-24.
 16. Guan, Y. F., Li, G. R., Wang, R. J., Yi, Y. T., Yang, L., Jiang, D., ... & Peng, Y. (2012). Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chinese journal of cancer*, 31(10), 463.
 17. Basho, R. K., & Eterovic, A. K. (2015). Clinical applications and limitations of next-generation sequencing. *American Journal of Hematology/Oncology®*, 11(3).
 18. Eisele, Marius, and Melanie Kappelman-Fenzl. "NGS Technologies." *Next Generation Sequencing and Data Analysis*. Springer, Cham, 2021. 47-58.)
 19. Low, Siew-Kee Kee, et al. "Evaluation of Genexus system that automates specimen-to-report for cancer genomic profiling within a day using liquid biopsy." (2020): 3538-3538.)
 20. (Catálogo da ThermoFisher, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A45727#/A45727>)
 21. (Gioia, Jason, et al. "Scalable single-day workflows for variant calling with the Genexus Integrated Sequencer." (2020): 1330-1330.
 22. Ilié, M., Hofman, V., Bontoux, C., Heeke, S., Lespinet-Fabre, V., Bordone, O., ... & Hofman, P. (2022). Setting Up an Ultra-Fast Next-Generation Sequencing Approach as Reflex Testing at Diagnosis of Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer; Experience of a Single Center (LPCE, Nice, France). *Cancers*, 14(9), 2258.
 23. Gu, J., Cao, R., Schageman, J., Lea, K., Kshatriya, P., Marcovitz, A., ... & Bramlett, K. (2020). Demonstration of the genexus integrated sequencing system with the oncomine precision assay. *Cancer Research*, 80(16_Supplement), 213-213.
 24. Sheffield, B. S., Beharry, A., Diep, J., Perdrizet, K., Iafolla, M. A., Raskin, W., ... & Cheema, P. K. (2022). Point of Care Molecular Testing: Community-Based Rapid Next-Generation Sequencing to Support Cancer Care. *Current Oncology*, 29(3), 1326-1334.
 25. Merriman, B., R&D Team, I. T., & Rothberg, J. M. (2012). Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*, 33(23), 3397-3417.

26. Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., ... & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, 13(1), 1-13.
27. Misyura, M., Zhang, T., Sukhai, M. A., Thomas, M., Garg, S., Kamel-Reid, S., & Stockley, T. L. (2016). Comparison of next-generation sequencing panels and platforms for detection and verification of somatic tumor variants for clinical diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(6), 842-850.
28. Tsongalis, G. J., Peterson, J. D., de Abreu, F. B., Tunkey, C. D., Gallagher, T. L., Strausbaugh, L. D., ... & Amos, C. I. (2014). Routine use of the Ion Torrent AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel for identification of clinically actionable somatic mutations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52(5), 707-714.
29. Trottier, A. M., de Andrade Silva, M. C., Li, Z., & Godley, L. A. (2019). Somatic mutation panels: time to clear their names. *Cancer Genetics*, 235, 84-92.

Anexo 1

The future of NGS is here

The Ion Torrent™ Genexus™ System
Provides a fast and automated end-to-end next-generation sequencing (NGS) solution, no matter your level of expertise.

Automating to reduce touchpoints

Touchpoint 1

- Nucleic acid (NA) extraction
- NA quantification
- Sequencing plate preparation
- Storage NA plate preparation

Touchpoint 2

- Library preparation
- Templating
- Sequencing
- Analysis

Research applications

-  Oncology
-  Inherited disease
-  Infectious disease**
-  Reproductive health**

Find out more at thermofisher.com/ngs

* Formalin-fixed paraffin-embedded tissue
** Genexus integrated Sequencer only

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2011 ThermoFisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of ThermoFisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. COL016026 0021

Touchpoint 1

Genexus™ purification system

Touchpoint 2

Genexus™ integrated sequencer

1 report

Easy to analyze

Benefits

- 1** day results possible
- 2** user touchpoints
- 20** min hands-on time

Workflows

Use Oncomine™ Precision Assay workflows for a variety of sample types. Detect key biomarkers in half the time it takes with standard sequencing.



Oncomine Precision Assay workflow

Standard workflow

ThermoFisher Scientific

Anexo 2

	Produto	Quantidade	Preço do produto	Preço do consumo por pool	Preço do consumo por amostra
Consumíveis	Sequencing Kit		XXXX	XXXX	XXXX
	Oncomine Focus Assay, AmpliSeq™ Library		XXXX	XXXX	XXXX
	Pipette Tips		XXXX	XXXX	XXXX
	Genexus™ Templating Strips 3-GX5™ and 4		XXXX	XXXX	XXXX
	GX5™ Chip and Genexus™ Coupler		XXXX	XXXX	XXXX
	Genexus™ Barcodes 1-96 AS		XXXX	XXXX	XXXX
Mão de obra	Genexus™ Library Strips 1 and 2 AS		XXXX	XXXX	XXXX
	Laboratório				
	Análise				
Equipamento	Mensalidade do leasing do equipamento				
	Planos de manutenção do equipamento				
Repetições & confirmações	Repetições e confirmações necessárias			5%	- €
					- €
Custos Direto					
Custos Indiretos					
	Custos indiretos (eletricidade, transportes, rendas)			30%	- €
Custo Total					
					- €