



Parecer sobre reporte de variantes de significado clínico incerto em relatórios de testes genéticos diagnósticos, aplicável a variantes de sequência mononucleotídicas e a inserções/deleções envolvendo segmentos com menos de 50 nucleotídeos, identificadas em probantes

A interpretação de variantes no contexto de uma análise genética depende de múltiplos fatores, sendo a caracterização fenotípica detalhada do doente em conjunto com os seus antecedentes familiares essenciais para uma análise adequada e rigorosa. As variantes genéticas podem ser classificadas, de acordo com os critérios de classificação de variantes de sequência propostos pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) e a *Association for Molecular Pathology* (AMP) em 2015, como patogénicas, provavelmente patogénicas, de “significado clínico incerto” (VSCI), provavelmente benignas e benignas (Tabela 1). As VSCI não são, por definição, clinicamente acionáveis: não devem ser utilizadas para sustentar decisões clínicas, incluindo de diagnóstico e de terapêutica, rastreio familiar, diagnóstico pré-sintomático, nem no âmbito de testes pré-implantação ou de diagnóstico pré-natal.

A probabilidade de identificação de VSCI aumenta proporcionalmente com a extensão do genoma analisado, com o nível de resolução molecular da metodologia utilizada e inversamente com o grau de conhecimento disponível sobre a variação genética da população de referência. A variação genética da população portuguesa está ainda insuficientemente caracterizada pelo que a frequência de identificação de VSCI ultrarraras ou privadas nos testes genéticos diagnósticos realizados atualmente é relativamente mais elevada do que noutras populações europeias.

A classificação de uma variante como VSCI não é definitiva, sendo suscetível de reclassificação à medida que surjam novos dados relevantes, sejam de natureza clínica, funcional ou populacional. A informação relativa a cada VSCI deve ser revista periodicamente, sendo consensual que essa reavaliação deve ser realizada a cada três a cinco anos.

Com a consolidação de bases de dados genómicos populacionais e a contínua melhoria do conhecimento sobre os determinantes genéticos das doenças, é previsível que a frequência de reporte de VSCI nos testes genéticos de diagnóstico venha a tornar-se residual na próxima década.

As VSCI podem ser classificadas num gradiente de probabilidade de patogenicidade que varia entre mais de 10% e menos de 90% — valores estes que correspondem, respetivamente, aos limiares superior de provável benignidade e inferior de provável patogenicidade, dos critérios de classificação de variantes de sequência propostos pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) e a *Association for Molecular Pathology* (AMP) em 2015 (Tabela 1). Importa notar que, em contexto clínico, as designações “provavelmente patogénica” e “patogénica” são sinónimas.

De acordo com as recomendações para a prática clínica da *Association for Clinical Genomic Science* (ACGS) publicadas em 2020, a probabilidade de patogenicidade das VSCI pode, por sua vez, ser quantificada numa escala categorial de 0 a 5, com base nas evidências disponíveis, integradas



num modelo estatístico Bayesiano, que pontua os critérios de classificação dos graus de evidência de patogenicidade propostos pela ACMG/AMP (Tabela 1) da seguinte forma: evidência “suportadora” (PP), 1 ponto; evidência “moderada” (PM), 2 pontos; evidência “forte” (PS), 4 pontos; evidência “muito forte” (PVS), 8 pontos.

A grande maioria das VSCI é classificada nos estratos inferiores daquela escala — representando, a maioria das vezes, variação alélica que é própria da diversidade genética das populações — tendo elevada probabilidade de vir a ser reclassificada como “provavelmente benigna” ou “benigna”.

Uma pequena fração das VSCI é classificada nos estratos mais elevados da escala categorial, com probabilidades de patogenicidade $\geq 67,5\%$, podendo considerar-se variantes com grau elevado ou muito elevado de potencial interesse clínico (Tabela 1). Nestes casos, se se verificarem as condições necessárias, pode ser possível, no âmbito da atividade assistencial, obter evidência adicional suficientemente forte que permita a reclassificação de uma VSCI em variante “(provavelmente) patogénica” (Tabela 2), com devida consideração de particularidades das doenças com hereditariedade autossómica recessiva (Tabela 3).

São exemplos de estudos adicionais que podem permitir a reclassificação de uma VSCI, indicando-se entre parenteses os correspondentes critérios de classificação da ACMG/AMP: o estudo genético dos progenitores do probante para esclarecer se a VSCI é herdada ou *de novo* (PM6/PS2); o estudo genético de familiares afetados para demonstrar a co-segregação (PP1/BS4); o estudo genético de familiares do probante para estabelecimento da co-herança em *cis* ou *trans* de VSCI; estudos clínicos e/ou laboratoriais (por exemplo, testes bioquímicos) que contribuam evidência de especificidade fenotípica (PP4); a análise de isoformas de ARNm para esclarecer o impacto biológico de VSCI que sejam preditas afetar o processo de montagem (PVS1[RNA]); estudos funcionais *in vivo* ou *in vitro*, bem estabelecidos, que demonstrem impacto deletério no gene ou no produto génico (PS3); ensaio terapêutico de um tratamento específico da etiologia genética (PP4).

O uso sistemático desta abordagem permite uma avaliação mais estruturada e transparente da classificação de cada VSCI e promove a harmonização da interpretação entre laboratórios. A pontuação agregada deve ser acompanhada da descrição dos critérios individuais aplicados, conforme definidos nas recomendações da ACMG/AMP e adaptados pela ACGS. Sempre que existam recomendações específicas para determinados genes, estas devem prevalecer.

O pedido de um teste genético diagnóstico deve incluir obrigatoriamente a caracterização clínica detalhada do doente e dos seus antecedentes familiares. Esta informação é crucial para reduzir a incerteza na interpretação dos resultados. Nos casos em que o laboratório não receba informação suficientemente detalhada sobre o fenótipo clínico do probante nem sobre os seus antecedentes familiares, é recomendável que contacte o respectivo médico assistente para obtenção dos dados adicionais pertinentes.

A inclusão de VSCI nos relatórios dos testes genéticos deve respeitar as políticas institucionais de reporte. Contudo, nos termos das recomendações da ACGS, apenas devem ser reportadas aquelas para as quais exista evidência plausível de relevância clínica, baseada na suspeita clínica e em dados contextuais adicionais. Sempre que uma VSCI conste de um relatório de teste genético essa informação deve ser



acompanhada de uma explicação clara sobre as limitações interpretativas e a ausência de aplicabilidade clínica imediata. Adicionalmente, os laboratórios de genética devem indicar que tipo de informação adicional poderia permitir a reclassificação de uma VSCI como “(provavelmente) patogénica”.

Este documento sumariza as recomendações do Colégio de Genética Médica para a inclusão de variantes de significado clínico incerto nos relatórios de testes genéticos.

1. Nos relatórios de testes genéticos só devem ser referidas VSCI quando estejam cumulativamente cumpridas as seguintes condições:
 - i) VSCI com pontuação 4 ou 5 da Tabela 1 (com potencial interesse clínico classificado como “elevado” ou “muito elevado”);
 - ii) Com enumeração dos critérios necessários para reclassificação da VSCI como variante “provavelmente patogénica/patogénica”.
2. O médico assistente do doente deve confirmar se é possível avaliar os critérios enumerados em 1.ii) e, apenas se concluir pela existência dessa possibilidade, deve solicitar a realização de estudos adicionais, incluindo testes genéticos para confirmar ou excluir que a VSCI em avaliação tem origem *de novo*, estudos de co-segregação em familiares e confirmação formal da maternidade e paternidade biológicas.
3. Os relatórios dos testes genéticos devem explicitar se os laboratórios procedem ou não à reavaliação periódica das VSCI notificando os médicos assistentes dos utentes sempre que ocorra uma alteração de classificação com relevância clínica. Adicionalmente:
 - i) Em caso afirmativo o laboratório deve referir no relatório do teste genético a periodicidade de realização da reavaliação da classificação das variantes;
 - ii) Em caso negativo o laboratório deve referir no relatório do teste genético que a reavaliação da classificação das variantes só será realizada após novo pedido do médico assistente o que se justifica cada 3 a 5 anos se o resultado puder ter utilidade clínica.

O laboratório responsável pela realização do teste poderá reportar excepcionalmente VSCI em circunstâncias não previstas nesta recomendação sempre que considere viável a sua reclassificação como “provavelmente patogénica/patogénica” identificando as condições necessárias para o fazer (consultar, a título indicativo, as Tabelas 4 e 5).

Recomenda-se que todos os laboratórios definam e divulguem os critérios de reporte de VSCI e de reavaliação das classificações das variantes.

A informação apresentada nesta recomendação tem um propósito informativo e não substitui uma consulta ou discussão com um médico especialista em Genética Médica. Caso tenha alguma dúvida sobre o conteúdo desta recomendação e a sua aplicabilidade no seu caso particular, deve consultar o seu médico assistente.



Bibliografia

Biesecker LG, Byrne AB, Harrison SM, et al. ClinGen guidance for use of the PP1/BS4 co-segregation and PP4 phenotype specificity criteria for sequence variant pathogenicity classification. *Am J Hum Genet.* 2024;111(1):24–38.

Brnich SE, Abou Tayoun AN, Couch FJ, et al. Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework. *Genome Med.* 2019;12(1):3.

Durkie M, Cassidy E-J; Berry I, et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease 2024. Available ACGS–Association for Clinical Genomic Science at: <https://www.acgs.uk.com>.

Ellard S, Baple EL, Callaway A, et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease 2020. Available from the ACGS–Association for Clinical Genomic Science, at: <https://www.acgs.uk.com>.

Fowler DM, Rehm HL. Will variants of uncertain significance still exist in 2023? *Am J Hum Genet.* 2024;111(1):5–10.

Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062–D1067.

MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature.* 2014;508(7497):469–476.

Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–424.

Tavtigian SV, Greenblatt MS, Harrison SM, et al. Modeling de ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. *Genet Med.* 2018;20(9):1054–1060.

Walker LC, Hoya M, Wiggins GAR, et al. Using the ACMG/AMP framework to capture evidence related to predicted and observed impact on splicing: Recommendations from the ClinGen SVI Splicing Subgroup. *Am J Hum Genet.* 2023;110(7):1046–1067.



TABELA 1. Estratificação das variantes de significado clínico incerto (VSCI) em função dos níveis de evidência em favor de patogenicidade.

Classificação de acordo com os critérios da ACMG/AMP	Combinação de critérios	Pontuação	Probabilidade <i>a posteriori</i>	Escala analógica espectral do potencial interesse clínico das VSCI
Patogénica		≥10	≥99 %	
Provavelmente patogénica		6 a 9	≥90 %	
Variantes de significado clínico incerto	1 forte + 1 suportador <i>OU</i> 2 moderados + 1 suportador <i>OU</i> 1 moderado + 3 suportadores	5	81,2 %	<i>muito elevado</i>
	1 forte <i>OU</i> 2 moderados <i>OU</i> 1 moderado + 2 suportadores <i>OU</i> 4 suportadores	4	67,5 %	<i>elevado</i>
	1 moderado + 1 suportador <i>OU</i> 3 suportadores	3	50 %	<i>moderado</i>
	1 moderado <i>OU</i> 2 suportadores	2	32,5 %	<i>reduzido</i>
	1 suportador	1	18,8 %	<i>muito reduzido</i>
		0	10 %	<i>diminuto</i>
Provavelmente benigna		-1 a -5	≤10 %	
Benigna		≤ -6	≤1,0 %	



TABELA 2. Critérios clínicos necessários para reclassificar como provavelmente patogénicas, variantes de significado clínico incerto com graus de interesse clínico «elevado» ou «muito elevado».

Classificação de acordo com os critérios da ACMG/AMP	Combinação de critérios	Pontuação	Pontuação mínima para reclassificação	Exemplos de critérios clínicos mínimos para reclassificação
Variantes de significado clínico incerto com grau de interesse clínico «muito elevado»	1 forte + 1 suportador OU 2 moderados + 1 suportador OU 1 moderado + 3 suportadores	5	1	<ul style="list-style-type: none">• Variante <i>de novo</i>, sem confirmação formal de maternidade e paternidade biológicas. OU• Co-segregação em pelo menos um indivíduo afetado, qualquer que seja a hereditariedade subjacente*.
Variantes de significado clínico incerto com grau de interesse clínico «elevado»	1 forte OU 2 moderados OU 1 moderado + 2 suportadores OU 4 suportadores	4	2	<ul style="list-style-type: none">• Variante <i>de novo</i>, com confirmação formal de maternidade e paternidade biológicas. OU• Co-segregação em pelo menos dois indivíduos afetados não-afetados, no caso de doenças com hereditariedade autossómica dominante ou recessiva ligada ao cromossoma X, ou num indivíduo afetado, no caso de doenças com hereditariedade autossómica recessiva*.

(*) A pontuação dos estudos de co-segregação familiar é o somatório de todas as meioses informativas disponíveis — conforme explicitado abaixo — com exclusão dos indivíduos em quem foi estabelecida a fase de segregação:

- Doenças com hereditariedade autossómica recessiva: 2 pontos por cada indivíduo afetado; 0,4 pontos por cada indivíduo não-afetado.
- Doenças com hereditariedade autossómica dominante: 1 ponto por cada indivíduo afetado|não-afetado.
- Doenças com hereditariedade recessiva ligada ao cromossoma X: 1 ponto por cada indivíduo de sexo masculino afetado | não-afetado.

A caracterização fenotípica detalhada dos familiares do probante, assim como a consideração da possibilidade de expressividade variável, de penetrância incompleta, de heterogeneidade génica e de existência de fenocópias, são requisitos metodológicos indispensáveis para validação dos estudos de co-segregação familiar.



TABELA 3. Critérios de reporte de variantes de significado clínico incerto (VSCI), em doenças autossómicas recessivas.

Classificação da ACMG/AMP	Critério de reporte	Notas explanatórias
VSCI com muito elevado ou elevado interesse clínico <i>E</i> Variante (provavelmente) patogénica	Sempre	Quando não seja possível obter critérios suficientes para reclassificação da VSCI como provavelmente patogénica, mas toda a evidência clínica e genética disponível seja suportadora do diagnóstico.
VSCI com interesse clínico muito elevado ou elevado, identificada em homozigotia	Se apropriado	<ul style="list-style-type: none">• Se os progenitores do probante forem consanguíneos.• Se o fenótipo clínico for consistente com a doença associado ao gene em apreço.• Para confirmação de segregação em fase <i>trans</i>.
VSCI com interesse clínico muito elevado ou elevado, identificada em heterozigotia composta	Se apropriado	<ul style="list-style-type: none">• Se o fenótipo clínico for consistente com a doença associada ao gene em apreço.• Para confirmação de segregação em fase <i>trans</i>.
VSCI identificada em heterozigotia	Nunca	O reporte de VSCI nestas circunstâncias não tem utilidade clínica e condiciona risco de má interpretação.



TABELA 4. Critérios clínicos potencialmente utilizáveis para reclassificar como provavelmente patogénicas, variantes de significado clínico incerto (VSCI) com graus de interesse clínico moderado, reduzido e muito reduzido.

Domínio da classificação da ACMG/AMP	Critérios de aplicação	Pontos	Notas explanatórias
Estudos adicionais exequíveis em contexto clínico			
Variante de novo	Com confirmação formal de maternidade e de paternidade biológicas	4	Suficiente para reclassificar como provavelmente patogénicas VSCI com graus de interesse clínico «moderado» (3 pontos) ou «reduzido» (2 pontos).
	Sem confirmação formal de maternidade e de paternidade biológicas	2	Insuficiente para reclassificar como provavelmente patogénicas VSCI com graus de interesse clínico «moderado» (3 pontos) ou «reduzido» (2 pontos), <i>na falta de evidência de estudos funcionais ou de análise de ARNm</i> .
Co-segregação familiar*	Doenças autossómicas recessivas	a)	<ul style="list-style-type: none">• Pontuação aditiva obtida da análise de meioses informativas, em estudos formais de co-segregação familiar. O grau de evidência gerado por estudos de co-segregação familiar depende da dimensão e da cooperação das famílias.
	Doenças autossómicas dominantes	b)	<ul style="list-style-type: none">• A pontuação máxima atribuível a estudos de co-segregação familiar é de 5<ul style="list-style-type: none">– permitindo, neste limite, reclassificar como provavelmente patogénicas VSCI com grau de interesse clínico «reduzido».
	Doenças ligadas ao cromossoma X recessivas	c)	<ul style="list-style-type: none">• Inversamente, <i>não deve ser ignorado que a demonstração da não segregação de uma VSCI com a doença genética em apreço é critério forte de benignidade</i>.
(*) Pontuação aditiva de todas as meioses informativas disponíveis, em estudos de co-segregação familiar devidamente validados, de acordo com a seguinte tabela:			
a) Doenças com hereditariedade autossómica recessiva: 2 pontos por cada indivíduo afetado; 0,4 pontos por cada indivíduo não-afetado.			
b) Doenças com hereditariedade autossómica dominante: 1 ponto por cada indivíduo afetado não-afetado.			
c) Doenças com hereditariedade recessiva ligada ao cromossoma X: 1 ponto por cada indivíduo de sexo masculino afetado não-afetado.			



TABELA 5. Estudos adicionais para reclassificação de variantes de significado clínico incerto (VSCI), realizáveis em colaboração com o médico assistente do probante, que poderão ser propostos pelo laboratório de genética.

Domínio da classificação da ACMG/AMP	Definição e critérios de aplicação	Comentários e notas práticas
Análise de expressão de ARNm	VSCI identificadas pelo laboratório como tendo potencial impacto deletério no processo de montagem do ARNm — visam a identificação e quantificação relativa de isoformas de ARNm	<ul style="list-style-type: none">• São exemplos de variantes de interesse para análise de expressão de ARNm: variantes localizadas nas regiões adjacentes a transições exão-intrão, incluindo variantes que afetem sítios canónicos e sequências reguladores da montagem de ARNm, assim como variantes exónicas sinónimas, localizadas nas extremidades dos exões; variantes intrónicas que possam afetar o processo de montagem do ARNm, seja por criação de novos sítios ou ativação de sítios crípticos.• Inversamente, a demonstração empírica da inexistência de impacto de uma VSCI na montagem do ARN é critério forte de benignidade.
Estudos funcionais	Estudos <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> devidamente validados que demonstrem impacto deletério (ou ausência de impacto) da VSCI na função biológica da proteína	<ul style="list-style-type: none">• Aplicável exclusivamente a estudos de proteínas.• Para serem considerados válidos, os estudos funcionais devem ser bem controlados, reproduutíveis e relevantes para o mecanismo patológico da doença em questão.