SOLICITAÇÃO	PACIENTE	MATERIAL
Nome: Dra Welida Cassa	Nome: João Eduardo Pereira Dias	Responsável pela coleta: SAMEL
CRM: ES 10999	Data de Nascimento: 06.05.2013	Tipo: DNA extraído de Sangue Periférico
Instituição: HINSG		Nº de Identificação: 990/22
Cidade: Vitória - ES		Data da coleta: 13.06.2022
		Data do resultado: 03.08.2022

Resultado do Exame: PAINEL PARA SÍNDROME DE NOONAN SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

COMPREENDENDO O TESTE GENÉTICO

Genoma é o conteúdo genético ou a informação hereditária de um organismo, codificada no DNA. O DNA é formado por uma dupla fita composta por nucleotídeos (base nitrogenada, açúcar e fosfato) e as bases nitrogenadas são designadas: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) e Citosina (C). O genoma, constituído por cerca de 3 bilhões de pares de base, é quase o mesmo em todos os indivíduos, porém com pequenas diferenças denominadas variações genéticas. Estas variações são responsáveis pelas diferenças das características fenotípicas entre as pessoas, como por exemplo: o tipo do cabelo, cor dos olhos, e também, por diferenças nas condições de saúde de cada ser humano.

A variante de nucleotídeo único (SNV – *Single Nucleotide Variant*) é um tipo de mutação, onde, por exemplo, uma única troca da base do nucleotídeo, ou "uma letra" (A, T, G, C) ocorre na sequência do DNA de um indivíduo comparado a outros e esta variação pode ser responsável por uma variação no fenótipo, ou seja, características próprias do indivíduo ou por uma doença.

Exemplo: Sequência 1: -AGCCTAA**T**GGGC-
Sequência 2: -AGCCTAA**G**GGGC-

Neste exemplo, a sequência 1 difere da 2 em apenas uma "letra", mas que pode interferir no fenótipo, como: na susceptibilidade pra determinada doença, resistência a fármacos, fatores de risco à exposições ambientais, etc...

No genoma existem regiões que são funcionalmente importantes responsáveis pela produção de proteínas que atuam no organismo, chamadas de exons. E existem regiões que não são traduzidas, denominadas de introns. O Sequenciamento de Nova Geração (NGS) realiza o sequenciamento e a análise dos exons dos genes relacionados ao quadro clínico e referidos na lista dos genes do painel solicitado.

Classificação das Variantes

As variações são classificadas de acordo com orientações do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG)[1] e baseada em informações de bancos de dados como o ClinVar[2]:

Benigna	Variante previamente conhecida e não associada à doença
Provavelmente Benigna	Variante com alta probabilidade de não estar associada à doença
Variante de Significado Incerto (*VUS*)*	Variante de significado incerto em relação à associação à doença
Provavelmente Patogênica	Variante com alta probabilidade de estar associada à doença
Patogênica	Variante previamente reconhecida como responsável pela doença

*VUS – *Variant of Uncertain Significance*

INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Atraso global do desenvolvimento, cardiopatia, baixa estatura e dismorfias.

RESULTADO

IDENTIFICADA VARIANTE QUE PODE ESTAR RELACIONADA AO FENÓTIPO RELATADO

Gene/Transcrito	Localização	Zigosidade	Doença OMIM	Herança	Classificação da variante
LZTR1 (ENST00000646124.2)	chr22:g.(?_20711332)_(20997348_?)del	Heterozigose	Síndrome de Noonan - 10	Autossômica dominante	Provavelmente Patogênica

Os resultados dos testes genéticos são relatados de acordo com as recomendações do *American College of Medical Genetics*[1].

A cobertura dos genes do painel da síndrome de Noonan é fornecida no apêndice.

INTERPRETAÇÃO DAS VARIANTES E CORRELAÇÃO CLÍNICA

VARIANTE 1 (Cromossomo 22)

Descrição da variante: Na análise *in sílico* de CNVs, foi identificada, em heterozigose, uma deleção contígua de aproximadamente ~286,02 kb abrangendo a região **chr22:g.(?_20711332)_(20997348_?)del** e envolvendo múltiplos genes, inclusive o gene *LZTR1*. A cobertura e a profundidade dessa região são suficientemente direcionadas e, portanto, os resultados são sugestivos de uma deleção em heterozigose dessa região [razão CNV: 0,58].

Fenótipo OMIM: A síndrome de Noonan-10 (**OMIM#616564**) pode ser causada por mutações em heterozigose no gene *LZTR1* (**OMIM*600574**). Esta condição é caracterizada por baixa estatura, dismorfismo craniofacial, pescoço curto e/ou alado, anormalidades cardíacas, criptorquidia e defeitos de coagulação[6].

Com base nas evidências acima, essa deleção contígua e em heterozigose é classificada como uma variante provavelmente patogênica e deve ser cuidadosamente correlacionada com os sintomas clínicos

O significado/classificação das variantes pode mudar com base em testes genéticos nos pais e outros membros da família.

RECOMENDAÇÕES

A especificidade dos ensaios baseados em NGS para detectar grandes deleções/duplicações é baixa e um método alternativo de teste como MLPA, Microarray ou PCR é recomendado para confirmar o mesmo.

Aconselhamento genético é recomendado.

Se os resultados obtidos não corresponderem aos achados clínicos, testes adicionais devem ser considerados conforme as recomendações do médico assistente.

LIMITAÇÕES

O teste genético é uma parte importante do processo diagnóstico. No entanto, os testes genéticos nem sempre dão uma resposta definitiva. Em alguns casos, o teste pode não identificar uma variante genética, mesmo que exista. Isso pode ser devido a limitações no conhecimento médico atual ou na tecnologia de teste. A precisa interpretação dos resultados dos testes pode exigir o conhecimento das verdadeiras relações biológicas em uma família. Não declarar com precisão as relações biológicas na família pode resultar em interpretação incorreta dos resultados, diagnósticos incorretos e/ou resultados de testes inconclusivos.

Os resultados dos testes são interpretados no contexto de achados clínicos, histórico familiar e outros dados laboratoriais. Apenas variações nos genes potencialmente relacionados à condição médica do probando são relatadas. A interpretação incorreta dos resultados pode ocorrer se as informações fornecidas forem imprecisas ou incompletas. Eventos específicos, como translocações, expansões repetidas e rearranjos cromossômicos, podem não ser detectados com confiabilidade com o sequenciamento direcionado do exoma. A sensibilidade deste teste para detectar grandes deleções/duplicações de mais de 10pb ou variações no número de cópias (CNV) é de 70 a 75%. As CNVs detectadas devem ser confirmadas por método alternativo. Variantes na região não traduzida, promotores e variantes intrônicas não são avaliadas usando este método. O teste genético é altamente preciso. Raramente, resultados imprecisos podem ocorrer por vários motivos. Esses motivos incluem, mas não se limitam a: amostragens erradas; relatórios imprecisos de informações clínicas/médicas; erros técnicos raros ou circunstâncias incomuns, como transplante de medula óssea, transfusão de sangue; ou a presença de alterações em uma porcentagem tão pequena de células que podem não ser detectáveis pelo teste (por exemplo, mosaicismo).

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE

A interpretação das variantes descritas neste relatório foi realizada com base no conhecimento atual, isto é, nas informações disponíveis no momento da elaboração do mesmo. A classificação das variantes pode mudar com o tempo e a Singular Medicina de Precisão não pode ser responsabilizada por isso. Não hesite em entrar em contato com a Singular Medicina de Precisão (contato@singularmp.com.br) no futuro para verificar se houve alguma alteração na classificação de quaisquer variantes. A reanálise de variantes em relatórios emitidos anteriormente, à luz de novas evidências, não é realizada rotineiramente, mas pode estar disponível mediante solicitação.

Também é possível que uma variante patogênica esteja presente em um gene que não foi selecionado para análise e/ou interpretação devido a informações fenotípicas disponíveis serem insuficientes. Genes com pseudogenes, genes parálogos e genes com baixa complexidade podem ter sensibilidade e especificidade diminuídas na detecção e interpretação de variantes, devido à incapacidade das ferramentas de análise de dados para determinar inequivocamente a origem dos dados de sequência nessas regiões. As mutações não foram validadas/confirmadas pelo sequenciamento de Sanger.

Descobertas incidentais ou secundárias (se houver) que atendem às diretrizes da ACMG[1] podem ser fornecidas mediante solicitação. O relatório deve ser gerado dentro do tempo previsto, no entanto, esse tempo pode variar dependendo da complexidade dos testes solicitados. A Singular Medicina de Precisão sob nenhuma circunstância será responsável por qualquer atraso, além do tempo previsto do resultado mencionado.

Fica esclarecido que os relatórios gerados a partir dos testes não fornecem nenhum diagnóstico ou opinião ou recomendam qualquer forma de conduta. A Singular Medicina de Precisão recomenda que o paciente e/ou seus responsáveis, conforme o caso, procurem o médico assistente ou um médico geneticista, para interpretar os relatórios gerados. A Singular Medicina de Precisão, por meio deste documento, se isenta de qualquer responsabilidade decorrente da conduta médica relacionada à interpretação dos resultados. A Singular Medicina de Precisão tem como parceiros laboratórios internacionais com certificação de alto e atualizados padrões de qualidade para a realização das análises genéticas. Este é um teste desenvolvido em laboratório parceiro da Singular Medicina de Precisão certificado pelo CAP (*College of American Pathologists*).

METODOLOGIA

Sequenciamento gênico direcionado: Foram realizados a captura e sequenciamento seletivo das regiões codificadoras de proteínas do genoma/genes. Mutações identificadas nas regiões exônicas são geralmente acionáveis quando comparadas com as variações que ocorrem nas regiões não codificantes. O sequenciamento direcionado representa uma abordagem econômica para detectar variantes presentes em múltiplos genes em um indivíduo.

O DNA extraído do sangue periférico foi usado para realizar a captura de genes direcionados usando um kit de captura personalizado. As bibliotecas foram sequenciadas para obter cobertura > 80-100X na plataforma de sequenciamento Illumina. Seguimos a estrutura de boas práticas do GATK para identificação de variantes na amostra usando o Sentieon[7] (v201808.07). As sequências obtidas foram alinhadas ao **genoma de referência humano (GRCh38.p13)** usando o alinhador Sentieon[7,8] e foram analisadas utilizando o Sentieon para remover duplicatas, recalibração e realinhamento de indels. O Sentieon haplotypecaller foi usado para identificar variantes relevantes para a suspeita clínica. A anotação genética das variantes é realizada usando o programa VEP[9] contra o modelo de gene humano do Ensemble[10] release 99.

Além dos SNVs e pequenos Indels, as variantes do número de cópias (CNVs) são detectadas a partir dos dados da sequência alvo, usando o método ExomeDepth[11] (v1.1.10). Esse algoritmo detecta CNVs raras com base na comparação das profundidades de leitura dos dados de teste com o conjunto de dados de referência agregado correspondente. Mutações clinicamente relevantes foram anotadas usando variantes publicadas na literatura e um conjunto de bancos de dados de doenças - ClinVar, OMIM (atualizado em 11 de Maio de 2020), GWAS, HGMD (v2020.2) e SwissVar[2,6,12–15]. As variantes comuns são filtradas com base na frequência do alelo no 1000Genome Phase 3, gnomAD (v2.1), EVS, dbSNP (v151), 1000 Japanese Genome e o Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM)[4–6,16,17]. O efeito de variantes não sinônimos é calculado usando vários algoritmos, como PolyPhen-2, SIFT, MutationTaster2 e LRT. Apenas variantes não sinônimas e do sítio de *splicing* encontradas nas regiões

codificantes foram utilizadas para interpretação clínica. Não foram relatadas variantes silenciosas que não resulta na troca de aminoácidos em regiões codificantes.

Tabela - Parâmetros de qualidade de sequenciamento

Total de dados gerados (Gb)	8,77
Total de sequências alinhadas (%)	99,97
Sequências com bom alinhamento (%)	93,60
Dados ≥Q30 (%)	97,08

REFERÊNCIAS

1. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–424 (2015).
2. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1062–D1067 (2018).f
3. Karczewski, K. J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **581**, 434–443 (2020).
4. Naslavsky, M. S. *et al.* Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum. Mutat.* **38**, 751–763 (2017).
5. Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* vol. 526 68–74 (2015).
6. Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Schiettecatte, F., Scott, A. F. & Hamosh, A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an Online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* **43**, D789–D798 (2015).
7. Freed, D., Aldana, R., Weber, J. A. & Edwards, J. S. The Sentieon Genomics Tools - A fast and accurate solution to variant calling from next-generation sequence data. *bioRxiv* 115717 (2017) doi:10.1101/115717.
8. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
9. McLaren, W. *et al.* Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* **26**, 2069–2070 (2010).
10. Zerbino, D. R. *et al.* Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D754–D761 (2018).
11. Plagnol, V. *et al.* A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics* **28**, 2747–2754 (2012).
12. Stenson, P. D. *et al.* The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Human Genetics* vol. 136 665–677 (2017).
13. Buniello A. *et al.* The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47 (Database issue): D1005-D1012
14. Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**, 275–282 (1992).
15. Mottaz, A., David, F. P. A., Veuthey, A. L. & Yip, Y. L. Easy retrieval of single amino-acid polymorphisms and phenotype information using SwissVar. *Bioinformatics* **26**, 851–852 (2010).
16. Exome Variant Server. https://evs.gs.washington.edu/EVS/.
17. Sherry, S. T., Ward, M. & Sirotkin, K. dbSNP - database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Research* vol. **9** 677–679 (1999).

Drª Kiyoko Abe Sandes
Bióloga
CRBio - 05.594/08D
Responsável Técnica

Drª Paula Brito Corrêa
Biomédica
CRBM - 1979

Dr Leandro Benevides
Biomédico Geneticista
CRBM - 12025

APÊNDICE

Segue abaixo a cobertura dos genes do painel da síndrome de Noonan.

Gene	Cobertura (%)	Gene	Cobertura (%)	Gene	Cobertura (%)
BRAF	100.00	*CBL*	100.00	*HGF*	98.21
HRAS	100.00	*KRAS*	100.00	*LZTR1*	100.00
MAP2K1	100.00	*MAP2K2*	100.00	*NF1*	100.00
NRAS	100.00	*PTPN11*	100.00	*RAF1*	100.00
RIT1	100.00	*SHOC2*	100.00	*SOS1*	100.00
SOS2	100.00				