Michelle Buscarilli de Moraes

Estudo clínico e molecular de pacientes com síndrome de Noonan e síndromes relacionadas à síndrome de Noonan pelo sequenciamento de nova geração

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do Titulo de Doutora em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Debora Romeo Bertola

São Paulo
2019

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo amor ágape, iluminando meu caminho, sempre com sabedoria; Aos meu pais, pelo apoio e amor incondicional, pela dedicação, base familiar, amor e paciência. Ao meu irmão e minha cunhada pela proteção e amor comigo. Ao meu noivo pelo amor e cuidado por mim. A minha orientadora Dra. Debora Bertola, por ser um exemplo de generosidade em todos os ensinamentos transmitidos.

“A vitória vem de uma vontade de fazer tudo certo, do início ao fim, de não se permitir errar, mas de dar de si o máximo absoluto.”

(Ayrton Senna)

AGRADECIMENTOS

Ao longo da vida, encontramo-nos com pessoas muito especiais. Assim posso definir todos da Unidade de Endocrinologia, que não só colegas de trabalho transformaram-se em grandes amigos. Gostaria de agradecer cada um pelos momentos divididos que jamais serão esquecidos.

Em primeiro lugar, a Deus por transmitir seu amor ágape, sempre iluminando meu caminho e permitindo que eu complete mais um ciclo na minha vida.

Aos meus pais, Ailton Paulo de Moraes e Vani Buscarilli de Moraes, a vocês não bastaria apenas um *muito-obrigada*. O que dizer de vocês, pessoas que me ensinaram tudo que sei, ensinaram-me a viver. Que me ampararam nas horas em que mais precisava, sabendo dizer, na dose certa, uma palavra amiga quando precisava de consolo, uma dura quando precisava de correção, sempre com sabedoria e justiça. A figura de vocês representa todo amor, respeito e consideração que possa existir. Sua honestidade e força são exemplo de vida e me dão o rumo do caminho que vou seguir. Queria poder retribuir, um dia, todo carinho e atenção que me deram. Ensinaram a andar e estavam lá, quando precisava para amparar minha queda. Ensinaram-me a falar e estavam lá para corrigir minhas palavras, a escrever e estavam lá para orientar meus primeiros rabiscos. Ensinaram-me a viver e tenho certeza de que posso contar com vocês em qualquer fase da minha vida, nos bons e maus momentos, sempre com dedicação e prontidão.

Espero poder, um dia, representar para meus filhos tudo aquilo que representam para mim, pois cultivo por vocês os sentimentos mais puros e verdadeiros que podem existir: o amor, o carinho, o respeito, e acima de tudo a admiração.

Agradeço todos os dias por poder compartilhar da companhia e convívio com vocês e, principalmente, por poder me orgulhar de ter vocês, pai e mãe, como também meus amigos, e por fazer parte de uma família, que cultiva os melhores sentimentos que existem: a paz, a compreensão e o respeito mútuo. Obrigada por tudo. Obrigada por serem pais maravilhosos. Obrigada por guiarem meus passos e por incentivarem, a cada dia, meus sonhos e objetivos. Obrigada pela oportunidade

de me fazerem alguém, para que eu possa retribuir, ao menos, um pouco de tudo que recebi de vocês.

Ao meu querido irmão, Wesley Buscarilli de Moraes e minha cunhada Cibele Ceconni por todo apoio, amor e carinho e prontidão sempre quando precisei. Vocês são exemplos para mim. Amo vocês.

Ao meu noivo, Rafael Bueno Texeira pelo apoio imensurável e compreensão na minha ausência. Por todo amor e cuidado por mim. Sempre ao meu lado, me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Minha vida mudou quando encontrei você. Obrigada, por um dia ter cruzado meu caminho e nunca mais ter largado minha mão. Te amo!.

À todos da minha família, tios (as) por todo carinho e apoio.

A Dra. Debora Bertola, minha gratidão, admiração e respeito pela oportunidade da orientação e de desenvolver este trabalho. Muito obrigada pelo privilégio de ser sua orientanda.

Ao Dr. Alexsander Jorge, minha gratidão pela atenção sincera e disponível, sempre com muita paciência, transmitindo seus conhecimentos de forma clara, sendo um exemplo de profissional, transformando um objetivo em realidade, obrigada por tudo.

À Elisangela Quedas, minha gratidão pela presteza e dedicação, por se transformarem em não só grande companheira de trabalho, mas grande amiga, parceira na qual pude dividir muitos momentos de alegrias e sei que o nosso crescimento profissional e científico continuara de forma impar. Obrigada por tudo que você fez e faz por mim.

À Camila Quedas, por todo apoio, amizade e dedicação.

À Ericka Traback, minha gratidão por todo ensinamento e parceria. Por estar sempre à disposição para ajudar, você faz parte da conclusão dessa tese.

Aos profissionais do Hospital das clínicas- Faculdade de medicina da USP, em especial aos funcionários em especial a Eliete Helena, Geni Rodrigues e Graça Cavalcanti, através de seu convívio agradável, permitindo a conclusão deste trabalho de forma tranquila.

Aos amigos Betsaida Urtremari e Lucas Santana, por todo apoio alegria e convívio agradável e pela amizade que as levarei comigo. Minha eterna admiração por vocês.

A minha amiga e companheira de todas as horas, Luiza Antoniazzi por todo apoio, parceria. Uma grande profissional e inspiradora, uma amiga irmã.

À Dra Chong Kim e Dr Guilherme Yamamoto por todo direcionamento e apoio para a conclusão desse trabalho.

À Mônica secretária da pós-graduação por todo auxílio e dedicação.

A todos os pacientes e familiares pela sua compreensão, por acreditar em nosso trabalho em prol da evolução científica, sobrepondo suas aflições tornando assim, este estudo possível.

À Capes, pelo apoio financeiro e científico.

A todas minhas amigas, que compreenderam bastantes vezes minhas ausência, obrigada pelo incentivo, carinho, amizade verdadeira, vocês fazem parte da concretização deste trabalho.

A todos, de forma geral, os meus imensos e infindáveis agradecimentos.

Sumário

Lista de Abreviaturas
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Resumo
Summary

1. Introdução 1
   1.1. Técnicas de Sequenciamento Gênico – Sequenciamento de Primeira Geração ou Sequenciamento de Sanger 2
   1.2. Técnicas de Sequenciamento Gênico – Sequenciamento de Segunda Geração ou Sequenciamento de Nova Geração..... 3
      1.2.1. Plataforma Illumina HiSeq/MiSeq 6
      1.2.2. Análise dos Dados 8
   1.3. Achados incidentais ou secundários 9
   1.4. Fenótipos monogênicos ou mendelianos 9
   1.5. Síndrome de Noonan (OMIM 163950) 11
      1.5.1. Conceito 11
      1.5.2. Aspectos clínicos da Síndrome de Noonan 11
      1.5.3. Aspectos Genéticos da SN e SRSN 14
         1.5.3.1. Sequenciamento de 1ª geração – Tradicional de Sanger 14
         1.5.3.2. Sequenciamento de Nova Geração – identificação de novos genes associados à SN 16
   1.6. Sequenciamento de Nova Geração – Teste diagnóstico na SN 19
   1.7. Correlação Genótipo-Fenótipo 20
2. Objetivos 23
   2.1. Objetivo principal 23
   2.2. Objetivos específicos 23
3. Casuística e Métodos 24
   3.1. Casuística 24
   3.2. Aspectos éticos 33
   3.3. Métodos 33

3.3.1. Extração do DNA genômico de linfócitos periféricos 33
3.3.2. Sequenciamento de Nova Geração NGS 34
3.4. Critérios para análise das variantes 36
3.5. Sequenciamento Sanger 40
3.6. Análise estatística 41
4. Resultados 42
4.1. Análise de pacientes através da plataforma Illumina 42
5. Discussão 59
5.1. NGS nas RASopatias: avaliação dos genes da via RAS/MAPK 59
5.2. NGS e possível novo gene associados às RASopatias 66
5.2.1. ACTC1 66
5.3. NGS e variantes patogênicas em genes associadas a outras doenças monogênicas 68
5.3.1. PACS1 68
5.3.2. KAT6A 69
5.3.3. ACTB 70
5.3.4. DPH1 71
5.3.5. Deleção intersticial em 19p 73
5.4. Risco de recorrência nas famílias 73
5.5. Considerações Finais 74
6. Conclusão 76
7. Anexos 77
8. Referências 80

Lista de abreviaturas

ACMG	Colégio Americano de Genética Médica e Genômica
AT	Atípico
AV	Atrioventricular
CFC	Síndrome Cardiofaciocutânea
CIA	Comunicação interatrial
CIV	Comunicação interventricular
CNVs	Variações Do Número De Cópias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPM	Desenvolvimento neuropsicomotor
EPSV	Estenose pulmonar supravalvar
EPV	Estenose da valva pulmonar
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOP	Forame Oval Pérvio
HGMD	*The Human Gene Mutation Database*
LAB	Laboratório
MIOCH	Miocardiopatia hipertrófica
NF1	Neurofibromatose tipo 1
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMIM	Banco de dados *Mendelian Inheritance in man*
PCR	Reação em cadeia de polimerase
SN	Síndrome de Noonan
SNLLAH	Síndrome Noonan-like com cabelos anágenos frouxos
SNML	Síndrome de Noonan com múltiplas lentigines
SNVs	S*ingle nucleotide variants*
SRSN	Síndromes relacionadas à síndrome de Noonan
ssDNA	Single stranded
VUS	V*ariant of uncertain significance*

Lista de Figuras

Figura 1: Descoberta de novos genes de 1981 a 2000. (Adaptado de Peltone e McKusick.; 2001).. 2

Figura 2: Queda exponencial no custo do sequenciamento de DNA, no período de 2002 a 2013. (Check., 2014).. 4

Figura 3: Fluxo de trabalho básico para projetos de sequenciamento de todo-exoma e todo-genoma. (Adaptado de Pabingerr et al, 2014) 5

Figura 4: Visão geral química do NGS: Illumina incluindo 4 etapas: a) preparação da biblioteca, b) amplificação, c) sequenciamento e d) alinhamento e análise de dados (Adaptado de Protocolo Illumina). 7

Figura 5: Diagrama esquemático da via de sinalização RAS/MAPK, mostrando os genes associados às diferentes RASopatias. Marcados com asteriscos estão os genes descobertos pelo emprego da técnica de NGS (Adaptado Aoki et al., 2016). 15

Figura 6: Análise pelo IGV de cobertura do éxon 8 do gene PTPN11 pela plataforma ilumina em dois probandos, com ausência de cobertura no caso superior e baixa cobertura no inferior. 52

Figura 7: Eletroferograma de parte do éxon 8 do gene PTPN11. A seta indica a a troca A>G na posição c.922. 52

Figura 8: Análise do IGV com a presença variante p.(Leu125Pro) no paciente F11994-1 no gene DPH1 e dois controles negativos. . . . 53

Figura 9: Análise IGV com a presença variante p.(Gly237Asp) no paciente F11994-1 no gene DPH1 e dois controles negativos. 53

Figura 10: Eletroferograma do probando F11994-1 e genitora do gene *DPH1*. Na seta indica a presença da variante p.(Leu125Pro) respectivamente. 54

Figura 11: Eletroferograma do probando F11994-1 e genitor do gene DPH1. Na seta indica a presença da p.(Gly237Asp) respectivamente. . . . 54

Figura 12: Variante em heterozigose no gene ACTC1 no probando (CC4965) e ausente nos pais (F10557-2 e F10557-3). 55

Figura 13: Variante em heterozigose no éxon 4 do gene LZTR1 no probando (F11522-1) 55
Figura 14: Eletroferograma de probando e genitora confirmando a presença da variante em heterozigose do gene LZTR1 em ambos.. 56

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais manifestações clínicas e suas frequências 12

Tabela 2: Caracterização clínica e genética da SN e das SRSN. Aoki et al., 2016; Gripp et al., 2016; Tydman & Rauen, 2016; Martinelli et al., 2018. 17

Tabela 3: Correlação genótipo-fenótipo entre genes associados à síndrome de Noonan. 22

Tabela 4: Critérios de diagnóstico da SN (Van der Burgt et al , 1994). 25

Tabela 5: Pacientes com hipótese diagnóstica de uma RASopatia incluídos neste estudo. 26

Tabela 6: Genes incluídos no painel para as RASopatias e suas taxas de cobertura respectivamente. 34

Tabela 7: Variantes identificadas em 64 probandos utilizando critério da ACMG pela plataforma illumina. 44

Tabela 8: Comparação pelo teste exato de Fisher as carcaterísticas clínicas observadas no presente estudo e em pacientes previamente estudados no Instituto da Criança divididos por grupos de genes 57

Tabela 9: Positividade do NGS e genes envolvidos em indivíduos avaliados por RASopatia no presente estudo e em estudo prévios da literatura 60

Lista de Quadros

Quadro 1: Tabela 1: Classificação de variantes segundo os critérios* da ACMG 2015** 38

Quadro 2: Quadro 2: Classificação de variantes segundo os critérios* da ACMG 2015**. 39

Resumo

Moraes MB. *Estudo clínico e molecular de pacientes com síndrome de Noonan e síndromes relacionadas à síndrome de Noonan pelo sequenciamento de nova geração* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: a síndrome de Noonan é a doença monogênica mais comum dentro do grupo das RASopatias, as quais são causadas por variantes em genes da via de sinalização RAS/MAPK e que se caracterizam por um envolvimento neurocardiofaciocutâneo. Uma nova técnica molecular, o sequenciamento de nova geração, capaz de gerar um grande número de dados genômicos em um único experimento, vem sendo empregado na última década com grande êxito na confirmação da hipótese clínica das doenças monogênicas, particularmente naquelas que apresentam uma grande heterogeneidade genética, assim como na descoberta de novos genes em doenças sem o conhecimento completo de suas bases moleculares, como é o caso da síndrome de Noonan.

OBJETIVOS: Avaliar as características clínicas e as bases moleculares responsáveis pela síndrome de Noonan e síndromes relacionadas à síndrome de Noonan.

MATERIAS E MÉTODOS: Foram incluídos 104 pacientes com suspeita clínica de uma RASopatia, 79 deles com síndrome de Noonan, classificados como casos típicos (55) ou atípicos (24), de acordo com critérios clínicos da literatura. O sequenciamento de nova geração incluiu o sequenciamento do exoma ou um painel de genes contendo aqueles já associados às RASopatias. RESULTADOS: variantes pontuais classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas em heterozigose foram encontradas em 59 probandos (57%): 59 delas em genes já associados às RASopatias, destacando-se o gene *PTPN11* pela frequência (28 indivíduos - 44%) e três variantes novas nos genes *NF1* e *MAP2K2*. Nos pacientes com síndrome de Noonan e classificados como típicos, a positividade do sequenciamento foi de 73%, bem superior ao observado nos casos atípicos (12,5%). Quatro indivíduos apresentaram variantes em genes associados a outras doenças monogênicas e um indivíduo apresentou uma microdeleção de 1,1Mb no

cromossomo 19p13.3 *de novo*. O exoma do trio em um indivíduo mostrou a presença de uma variante *de novo* em *ACTC1*, gene associado anteriormente a alterações cardíacas. Entre os achados clínicos, dois indivíduos com variantes em *NRAS*, um com uma variante incomum no gene *HRAS* e outro em *PPP1CB* apresentaram fenótipos distintos ou com achados clínicos ainda não descritos, ampliando o espectro de características clínicas nas RASopatias.

CONCLUSÕES: O sequenciamento de nova geração foi efetivo tanto na confirmação diagnóstica no grupo das RASopatias, particularmente naqueles casos de síndrome de Noonan considerados típicos, como na ampliação fenotípica associada a genes específicos, como *NRAS, HRAS* e *PPP1CB*. Permitiu ainda a identificação de uma variante no gene *ACTC1* em um indivíduo com síndrome de Noonan típico, sugerindo que seu produto gênico desempenhe um papel mais amplo no desenvolvimento fetal.

Palavras - chaves: síndrome de Noonan; análise de sequência de DNA; sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; doenças genéticas inatas; genética; biologia molecular.

Summary

Moraes MB. Clinical and molecular study of patients with Noonan syndrome and Noonan-related disordersby next-generation sequencing [thesis].São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: Noonan syndrome is the most common monogenic disorder within the RASopathies group,all of them caused by variants in genes of the RAS/MAPK signaling pathway and characterized by neurocardiofaciocutaneous involvement. A new molecular technique, the next-generation sequencing, capable of generating a large number of genomic data in a single experiment, has been used in the last decade with great success in confirming the clinical hypothesis of monogenic diseases, particularly in those with a great genetics heterogeneity, as well as in the discovery of new genes in diseases without the complete knowledge of its molecular bases, as is the case of Noonan syndrome.

OBJECTIVES: To evaluate the clinical characteristics and molecular basis of Noonan syndrome and Noonan-related disorders.

MATERIALS AND METHODS: We included 104 patients with clinical suspicion of a RASopathy, 79 of them with Noonan syndrome, classified as typical (55) or atypical (24) cases, according to clinical criteria from the literature. Next-generation sequencing included exome sequencing or a panel of genes containing those already associated with RASopathies.

RESULTS: Pathogenic heterozygous variants classified as pathogenic or probably pathogenic were found in 59 probands (57%): 59 of them in genes already known to be associated with RASopathies, highlighting the high frequency of variants in *PTPN11* (28 individuals - 44%) and three new variants in the *NF1* and *MAP2K2* genes. In patients with Noonan syndrome and classified as typical, the diagnostic yield was 73%, much higher than that observed in atypical cases (12.5%). Four individuals showed variants in genes associated with other monogenic diseases and one individual had a *de novo* microdeletion of 1.1Mb on chromosome 19p13.3. The exome of the trio in one individual showed the presence of a variant *de novo* in *ACTC1*, a gene previously associated with cardiac abnormalities. Among the clinical findings, two individuals with variants in *NRAS*, one with an uncommon variant in the

HRAS gene and another in *PPP1CB* presented distinct phenotypes or with clinical findings not yet described, broadening the clinical spectrum in the RASopathies. **CONCLUSIONS:** Next-generation sequencing was effective in confirming the clinical diagnosis in the RASopathy group, particularly in those cases of Noonan syndrome considered typical, as well as in contributing to the phenotypic delineation associated with specific genes, such as *NRAS*, *HRAS* and *PPP1CB*. It also allowed the identification of a variant in the *ACTC1* in an individual with typical Noonan syndrome, suggesting that its product may play a larger role in fetal development.

Descriptors: Noonan syndrome; sequence analysis, DNA; high-throughput nucleotide sequencing; genetic diseases, inborn; Genetics; molecular biology.

1. INTRODUÇÃO

Os conhecimentos sobre o material genético humano vêm sofrendo uma evolução ao longo do tempo. Embora os princípios da hereditariedade tenham sido delineados pelo monge e biólogo austríaco Gregor Mendel há mais de 150 anos, dois marcos importantes para a caracterização e o estudo propriamente dito da unidade genética humana - o ácido desoxirribonucleico (DNA) - só ocorreram no século XX: na década de 1950, Watson e Crick desvendaram a estrutura tridimensional do DNA e, em 1975, Sanger e Coulson desenvolveram uma técnica que permitia determinar a sequência dos nucleotídeos do material genético, o sequenciamento do DNA. Esta técnica passou a ser conhecida como o sequenciamento de Sanger e é amplamente empregada até hoje, extremamente útil na identificação de variações no material genético que são responsáveis por doenças genéticas, particularmente nas doenças monogênicas ou mendelianas, nas quais uma alteração em um único gene pode ser responsável pelo fenótipo. Na década de 1990, deu-se início o Projeto do Genoma Humano, com o intuito de desvendar todo o material genético da espécie humana. Finalizado em 2004, permitiu estabelecer uma referência para o material genético em nossa espécie, além da identificação do número total de genes, ao redor de 19.000. Este projeto alavancou o desenvolvimento de técnicas mais robustas de sequenciamento, permitindo a análise de diversos segmentos de DNA simultaneamente e com preços mais acessíveis, rapidamente sendo incorporadas na pesquisa e, posteriormente, na prática clínica nas últimas duas décadas. A técnica deste sequenciamento paralelo massivo é denominada Sequenciamento de 2ª Geração ou Nova Geração, em contrapartida ao sequenciamento Sanger, de 1ª geração (Chong et al., 2015; Heather e Chain, 2016; Shendure et al., 2017).

1.1. Técnicas de sequenciamento gênico – Sequenciamento de Primeira Geração ou Sequenciamento de Sanger

Na década de 1970, Sanger e Coulson desenvolveram o sequenciamento das bases de DNA utilizando um método enzimático, pela DNA polimerase. Empregado até hoje, este método consiste na utilização de dideoxinucleotídeos marcados por fluorescência, atuando como finalizadores da cadeia do sequenciamento. Segmentos pequenos de DNA são sequenciados isoladamente, em geral as regiões exônicas dos genes. Embora as regiões gênicas que codificam uma proteína (éxons) correspondam apenas a 1 a 2% do genoma, a grande maioria dos fenótipos mendelianos decorre de uma mutação ou mais recentemente o termo empregado é variante exatamente na região exônica ou nas bordas dos éxons, na região responsável pelo mecanismo de excisão dos íntrons (splicing), com consequente alteração na função do produto codificado por esse gene.

Está técnica revolucionou o estudo das bases moleculares de doenças genéticas, permitindo a descoberta de diversos genes responsáveis por esses fenótipos. O número crescente de genes descobertos relacionados a síndromes genéticas está representado na figura 1. (Peltonem & McKusick, 2001).

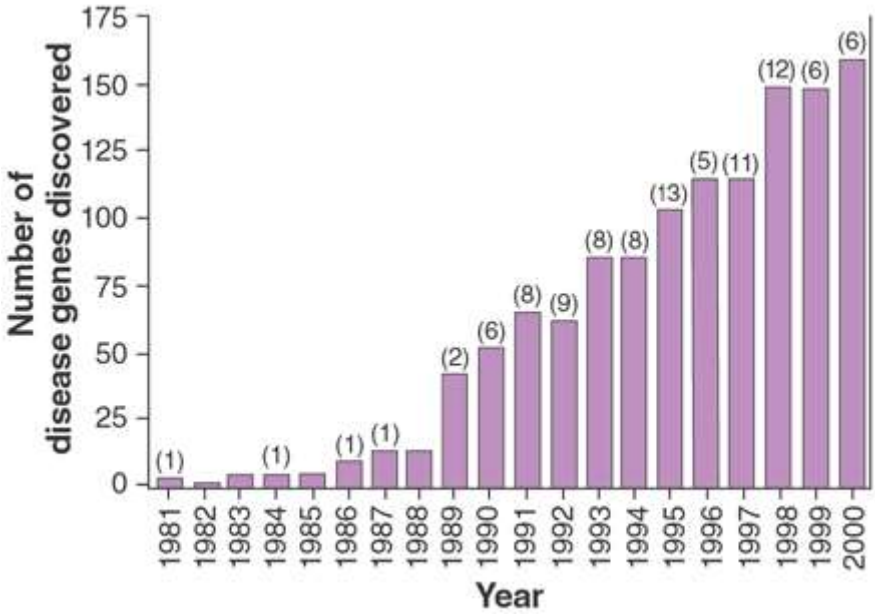

Figura 1: Descoberta de novos genes de 1981 a 2000. (Adaptado de Peltone e McKusick.; 2001).

As limitações do emprego desta técnica incluem o baixo rendimento em termos de material gerado para análise e a falta de detecção de variantes presentes numa frequência baixa, em situações de mosaicismo, além do custo, que ainda é alto quando se considera o sequenciamento de cada base de DNA (Morey et al., 2013).

1.2. Técnicas de Sequenciamento Gênico – Sequenciamento de Segunda Geração ou Sequenciamento de Nova Geração.

O Sequenciamento de Nova Geração (next-generation sequencing), massivo e em paralelo, permite a geração de um número grande de dados, também direcionado principalmente para a identificação de variantes de ponto e pequenas inserções e deleções (in/dels) no material genético. Pode-se obter o estudo do genoma completo (de novo ou ressequenciamento) ou, alternativamente, capturar regiões de interesse, como a região codificadora de todos os genes (sequenciamento do exoma) ou de um grupo de genes de interesse (painéis de genes – targeted sequencing).

O primeiro equipamento disponível para o NGS data de 2004 e, desde então, diversas plataformas foram desenvolvidas neste curto espaço de tempo, com uma diminuição vertiginosa no custo do sequenciamento, tornando o NGS uma prática cotidiana em diversos laboratórios de pesquisa e diagnóstico ao redor do mundo (figura 2). A grande vantagem desta técnica é o grande número de dados gerados para análise. Os fatores que são levados em consideração na evolução desta técnica incluem o tamanho do fragmento que será analisado, o rendimento, a acurácia da leitura e a sua profundidade (número de vezes que cada base é sequenciada em eventos independentes). As limitações desta técnica incluem o tamanho do fragmento, que não é tão longo como nas técnicas tradicionais, além de este fato resultar em um alongamento não sincronizado, o que pode gerar um sinal fluorescente ambíguo (Morey et al., 2013).

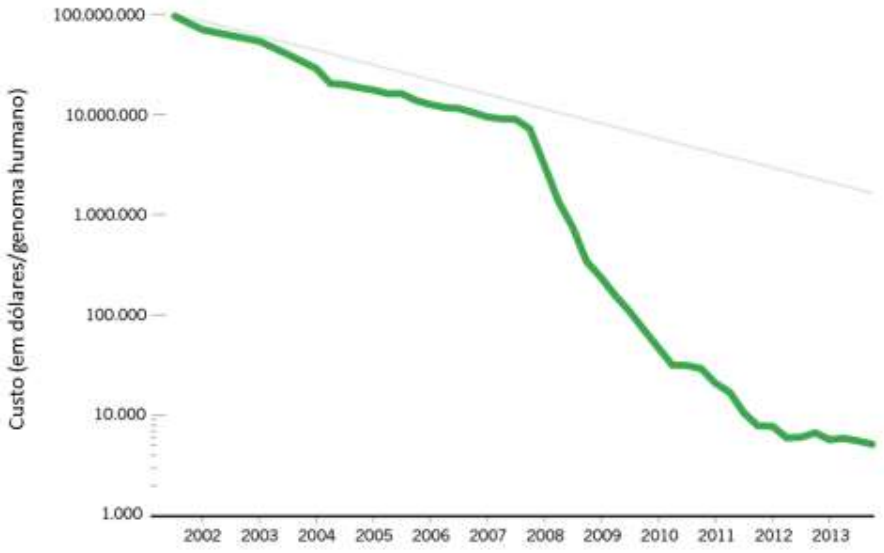

Figura 2: Queda exponencial no custo do sequenciamento de DNA, no período de 2002 a 2013. (Check., 2014).

Independentemente da plataforma aplicada, vários passos são comuns: o DNA extraído deve ser fragmentado por métodos mecânicos ou enzimáticos, seguido da preparação de uma biblioteca da análise de bioinformática. Nesta etapa, os adaptadores, sequências universais conhecidas e específicas para cada plataforma, são incorporados em cada extremidade dos fragmentos de DNA para permitir uma amplificação por uma reação em cadeia da polimerase (PCR), seja pelo emprego de um par de primers, seja pelo uso de sondas complementares aos adaptadores que unirão os fragmentos a uma superfície (figura 3). O tamanho do fragmento de leitura é uma função da razão sinal/ruído, e por isso ocorre uma limitação para sequenciar apenas pequenos fragmentos, menores do que é possível fazê-lo pelo sequenciamento de Sanger.

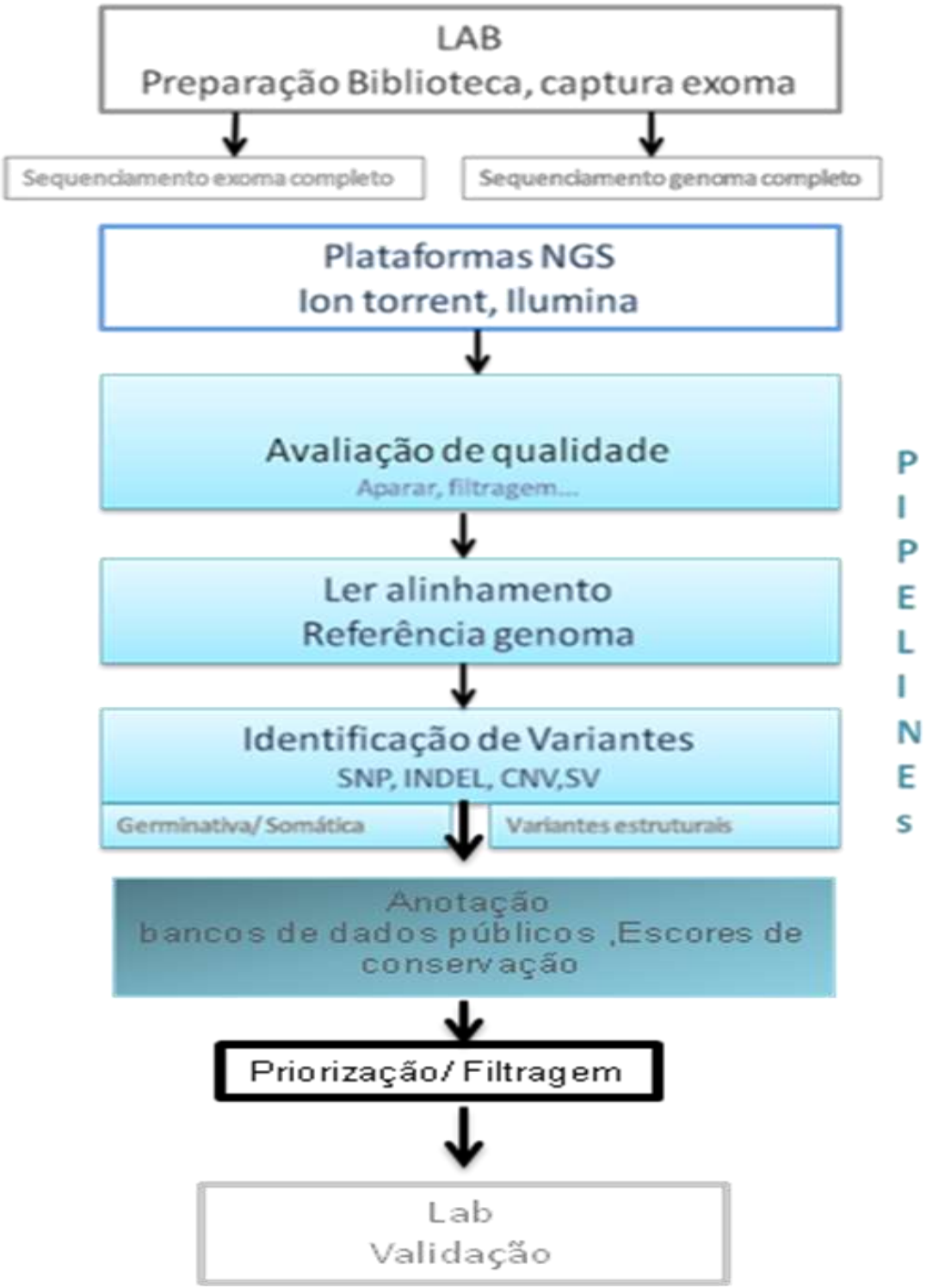

Figura 3: Fluxo de trabalho básico para projetos de sequenciamento de todo-exoma e todo-genoma. (Adaptado de Pabingerr et al, 2014)

O genoma humano é complexo e repetitivo, contém cerca de 48% de regiões repetitivas. Os fragmentos pequenos são mais trabalhosos de alinhar a esse

conteúdo. A estratégia para aumentar a confiança e credibilidade no alinhamento desses pequenos fragmentos é o emprego de leitura pareada, ou seja, (lado a lado) do fim do fragmento (paired end read). Nesta estratégia, a plataforma consegue realizar a leitura do fragmento com tamanho menor que 1KB com precisão, por meio de adaptadores nas duas extremidades, iniciando a primeira leitura por um primer e a segunda pelo primer da ponta oposta do fragmento. Estas leituras pareadas, uma oposta a outra, aumentam a confiança do mapeamento e o alinhamento com o genoma-referência. (Mardis., 2013).

1.2.1. Plataforma illumina Hiseq/Miseq

A plataforma Illumina é a mais utilizada nos dias atuais mundialmente, tendo sido desenvolvida no início de 2000 pela empresa americana Solexa, tornando-se comercialmente disponível em 2006. Aparelhos com diferentes capacidades de sequenciamento foram desenvolvidos, como o MiSeq e o HiSeq. O MiSeq utiliza a tecnologia de sequenciamento por síntese, une velocidade e simplicidade para o sequenciamento de volume de dados intermediários, proporcionando acesso às mesmas bibliotecas e kits utilizados pela plataforma Hiseq, porém com um tempo de resposta e custo por corrida mais acessíveis. Indicada para aplicações que vão desde sequenciamento de pequenos genomas, genes alvo ou amplicons, a análises de metagenômica e expressão de genes alvo, esta plataforma gera até 15 Gb de informação ou 25 milhões de leituras de até 300 pb por corrida.

Esta plataforma é considerada um equipamento multifuncional, uma vez que tem a capacidade de realizar todas as etapas em um único aparelho. O aparelho MiSeq tem menor capacidade de geração de dados e menor tamanho, sendo indicadas para laboratórios de menor porte (Lin et al., 2012). Na plataforma Illumina, a biblioteca é construída a partir da fragmentação de DNA, que se liga a adaptadores, ou seja, sequências complementares de oligonucleotídeos que estão presentes na placa (Flowcell). Esses segmentos são amplificados pela polimerase formando clusters, que irão conter cada um deles aproximadamente 1000 amplicons (PCR de fase sólida). Após aplicação de uma enzima de linearização, as duplas fitas de DNA (double stranded – dsDNA) são transformadas em fita simples (single stranded DNA – ssDNA). Uma mistura de nucleotídeos terminadores são marcados e adicionados de acordo com a complementaridade; a fluorescência do nucleotídeo

adicionado é capturada e gravada. Com a remoção do bloquear, um novo ciclo de adição de nucleotídeos se inicia, permitindo a síntese de uma nova fita e o sequenciamento base a base (figura 4).

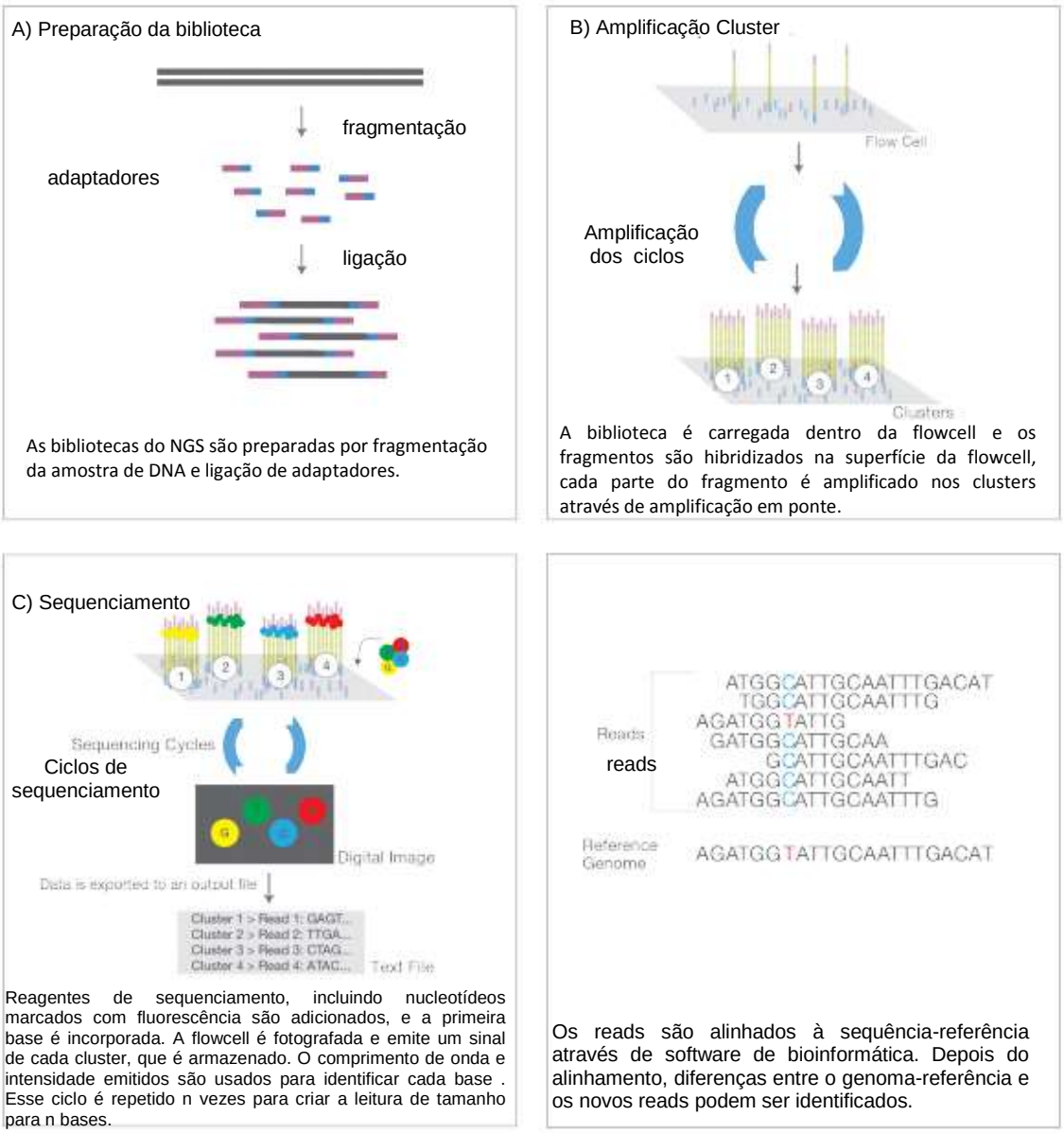

Figura 4: Visão geral química do NGS: Illumina incluindo 4 etapas: a) preparação da biblioteca, b) amplificação, c) sequenciamento e d) alinhamento e análise de dados (Adaptado de Protocolo Illumina).

Essa plataforma é de aproximadamente 600 Gb por célula de fluxo com 6 bilhões de leituras e uma precisão de 99,9%, em aproximadamente 11 dias (Morey et al.,2013). O custo de sequenciamento é de $2 por megabase.

1.2.2. Análise dos dados

O grande volume de dados gerados pelos sequenciadores de nova geração requer o emprego de ferramentas de bioinformática altamente sofisticadas, a fim de que a única ou as poucas alterações genéticas de interesse sejam identificadas em meio a centenas ou milhares de alterações não relacionadas ao fenótipo (polimorfismos e variantes raras não associadas ao fenótipo). Este processo é realizado por diversos programas computacionais que funcionam em cadeia (ou pipelines). Inicialmente, os dados brutos gerados pelo sequenciador (as sequencias propriamente ditas – arquivo *.fastq) precisam ser mapeados e alinhados no genoma-referência, gerando no final um arquivo *.bam. Em seguida, são listadas todas as alterações divergentes da sequência-referência - Variant Call Format (VCF), tipicamente, algumas centenas ou milhares de alterações, o que tornaria impossível a verificação manual de cada uma delas. É feito um processo de filtragem destas alterações por meio do cruzamento de informações de bancos de dados públicos, alimentados continuamente e, portanto, mais robustos com o passar do tempo, que compreendem mais de 99% das variantes alélicas existentes em seres humanos (1000 genomes - http://www.1000genomes.org/, dados genômicos da população brasileira – www.abraom.ib.usp.br, entre outros) e ainda do emprego de algoritmos que predizem in silico o impacto funcional de determinadas variantes.

O Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG) estabeleceu diretrizes, universalmente utilizadas, para classificar as variantes em cinco categorias: patogênica, provavelmente patogênica, variante de significado incerto (variant of uncertain significance - VUS), provavelmente benigna e benigna. Para obter esta classificação, diversos fatores são levados em consideração e recebem um peso, que pode ser muito forte, forte e moderado, de suporte (para a classificação como patogênica) e um critério único suficiente (para a classificação como benigna). Os fatores analisados incluem a frequência da variante em populações controle e em afetados, ferramentas de bioinformática de predição de dano à proteína codificadas pelo gene, estudos funcionais já realizados mostrando

efeito deletério ou não, dados de segregação da variante na família nos casos familiais, comprovação de um evento de novo nos casos isolados, variantes encontradas respeitando o padrão de herança estabelecido para a doença, presença de um fenótipo no paciente ou nos familiares compatível com o papel do gene no caso de variante patogênica ou variante presente em um indivíduo que apresenta outra causa plausível para o seu fenótipo, no caso de variante benigna. (quadro1 e 2) (Richards et al., 2015).

Embora a aplicação principal seja a identificação de variantes pontuais, single nucleotide variants – SNVs e pequenas inserções/deleções, programas desenvolvidos mais recentemente também são capazes de detectar microdeleções/microduplicações, as denominadas variações do número de cópias (CNVs). No entanto, até o presente, este exame não é considerado tão acurado quando o array genômico (Wright et al., 2018).

1.3. Achados incidentais ou secundários

Na análise genômica, particularmente naquelas amplas, como o sequenciamento do exoma, podem ser encontradas variantes não relacionadas à indicação primária do teste, os denominados achados incidentais ou secundários. Pelo fato de algumas destas variantes poderem apresentar um impacto no seguimento médico do indivíduo, o ACMG emitiu pareceres com uma lista de genes associados a diversas síndromes, como aquelas de predisposição ao câncer hereditário, algumas hamartomatoses, doenças com acometimento cardiovascular, entre outras, que podem ser informadas ao indivíduo, mediante seu desejo expresso (Kalia et al., 2017).

1.4. Fenótipos monogênicos ou mendelianos

Como o emprego do sequenciamento gênico tem sua grande contribuição na caracterização de mudanças na sequência do DNA em genes, esta é a técnica de escolha para o estudo das bases etiológicas das doenças mendelianas ou monogênicas, um grupo amplo de fenótipos decorrentes, na grande maioria dos

casos, de variante(s) rara(s) (com uma frequência populacional menor que 1% ou mesmo ausente) em um gene único.

De acordo com a localização do gene, se em um cromossomo autossomo ou no cromossomo sexual X, e na necessidade da presença de uma variante em uma única cópia do gene ou em ambas as cópias para a expressão fenotípica, essas doenças são classificadas nos seguintes padrões clássicos de herança: autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao X dominante e ligada ao X recessivo.

No catálogo de doenças mendelianas on-line, Mendelian Inheritance in Man - OMIM (www.omim.org), com dados atualizados em abril de 2019, estão descritos 7077 fenótipos, sendo 5510 com base molecular conhecida e 1567 sem base molecular definida. Além disso, outros 1755 fenótipos estão incluídos, nos quais há a suspeita de uma base genética mendeliana para a sua etiologia. Desta forma, observa-se que o número de doenças mendelianas é extenso, constituindo um grupo importante de doenças genéticas avaliadas na prática da Genética Médica. Em conjunto, as doenças mendelianas representam 0,4% de todas as doenças reconhecidas ao nascimento e, incluindo todas as anomalias congênitas, aproximadamente 8% dos nascidos vivos apresentarão uma doença genética identificada até o início da vida adulta. Os defeitos congênitos, nos quais as doenças mendelianas provavelmente exercem uma grande influência, são a causa mais comum de óbito no 1º ano de vida nos Estados Unidos (Chong et al.,2015).

Variantes raras em aproximadamente 1500 genes já foram descritas como responsáveis por doenças de desenvolvimento, embora ainda vários fenótipos permaneçam sem etiologia definida. O diagnóstico preciso para um indivíduo permite que haja uma orientação mais adequada quanto às questões médicas, o que pode direcionar um acompanhamento e/ou uma terapêutica mais precisa, além de permitir acesso a grupos de apoio específico para um doença ou grupo de doenças. Outro fator importante é determinar um risco de recorrência mais acurado para o indivíduo e sua família, com benefício para tomada de decisões quanto ao planejamento reprodutivo futuro (Wright et al., 2018).

Apesar de todos os avanços técnicos e médicos, ainda o diagnóstico destas doenças raras é um grande desafio, seja por não haver ainda uma etiologia definida, seja pela grande variabilidade clínica de um determinado fenótipo (expressividade variável), comum em diversas doenças mendelianas (Wright et al., 2018). Até pouco tempo atrás, a técnica utilizada para detectar alterações na sequência do DNA,

especialmente nas regiões codificadoras dos genes, era o sequenciamento de Sanger (Sanger e Coulson, 1975). Recentemente, a técnica do sequenciamento de nova geração (SNG) tem-se mostrado muito promissora tanto em aumentar a positividade do diagnóstico como em diminuir o tempo para estabelecer este diagnóstico. Embora a positividade desta técnica esteja atualmente em 25-30%, ela é maior do que aquelas obtidas com o estudo cromossômico (5%) e com o array genômico (15-20%) (Chong et al., 2015).

Uma das doenças monogênicas com uma grande variabilidade de expressão fenotípica e com heterogeneidade genética de loco é a síndrome de Noonan.

1.5. Síndrome de Noonan (omim 163950)

1.5.1. Conceito

A síndrome de Noonan –SN, reconhecida como uma entidade distinta em 1963 por Noonan e Ehmke, é uma doença predominantemente autossômica dominante, com incidência estimada entre 1:1.000 a 1:2.500 nascimentos (Noonan, 1968; Nora et al., 1974), com distribuição semelhante em ambos os gêneros, porém a maioria é de casos esporádicos (Shaw et al., 2007). Recentemente, a existência de uma forma da SN com um padrão autossômico recessivo foi confirmada pela identificação de variantes bialélicas no gene *LZTR1* (Johnston et al, 2018).

1.5.2. Aspectos clínicos da Síndrome de Noonan

A SN caracteriza-se pelo acometimento de diversos órgãos e sistemas, sendo seus principais achados a baixa estatura de origem pós-natal, características faciais incomuns, como hipertelorismo ocular, inclinação ínfero-lateral das fendas palpebrais, ptose palpebral, proptose, orelhas baixo-implantadas e com espessamento superior da hélice, pescoço curto e/ou alado, deformidade torácica, sendo comum a presença de um pectus em S (pectus carinatum superiormente e excavatum inferiormente), cardiopatia congênita, especialmente a estenose pulmonar valvar e a miocardiopatia hipertrófica, criptorquidia nos indivíduos do sexo masculino, deficiência intelectual, em geral de grau leve, e diátese hemorrágica,

sendo a mais frequente a deficiência do fator XI de coagulação (Romano et al., 2010) (tabela 1). Embora a penetrância seja completa, há uma grande variabilidade da expressão fenotípica na SN, tanto inter como intrafamilial, além de uma atenuação das características faciais com a idade (Allanson;1987).

Tabela 1: Principais manifestações clínicas e suas frequências.

Quadro clínico	***Principais manifestações***	***Frequência***
Achados craniofaciais	Inclinação ínfero-lateral das fendas palpebrais; Hipertelorismo ocular; Ptose palpebral; Proptose; Presença de nervos corneanos espessados; Má oclusão dentária; Palato alto; Orelhas baixo-implantadas	95%
Pescoço	Excesso de pele na região da nuca;	95%
	Pescoço alado	32%
	Baixa implantação de cabelos na nuca	
Achados cardíacos	Cardiopatia congênita;	50%-75%
	Estenose Valvar Pulmonar;	50%
	Miocardiopatia Hipertrófica;	20%
	Anomalias do sistema linfático	20%

Achados abdominais	Esplenomegalia	53%
Achados geniturinários	Criptorquidia Atraso puberal	60%
Achados esqueléticos	*Pectus carinatum;* *Cubitus valgus;* Clinobraquidactilia ; Anomalias vertebrais e esternais; Má oclusão dentária	70% 50% 30% 25%
Achados hematológicos	Defeitos da coagulação , incluindo deficiência de fator XI ou XII; Disfunção plaquetária; Doença de Willebrand	20%
Achados neurológicos	Deficiência mental; Atraso do desenvolvimento motor; Dificuldade de aprendizagem;	35% 26% 15%
Crescimento	Déficit estatural	50%

Existem outras síndromes raras cujas características fenotípicas, particularmente as faciais, além do déficit de crescimento e anomalias cardíacas, sobrepondo-se às da SN, denominadas síndromes relacionadas à síndrome de Noonan (SRSN) (Tartaglia et al., 2011). Dentre elas destacam-se a síndrome de Noonan com múltiplas lentigines (SNML – OMIM 151100), a síndrome de Costello

(SC – OMIM 218040), a síndrome cardiofaciocutânea (CFC – OMIM 115150), a neurofibromatose tipo 1 (NF1 –OMIM 162200) e a síndrome Noonan-like com cabelos anágenos frouxos (NLLAH – OMIM 607721). Todas estas síndromes, incluindo a SN, decorrem de mutações em genes da via de sinalização RAS/MAPK, recebendo a denominação conjunta de RASopatias, o que explica a sobreposição fenotípica observada entre elas (Figura 5) (Tidyman & Rauen, 2009).

As principais características clínicas das RASopatias estão descritas na tabela 2.

1.5.3. Aspectos genéticos da SN e SRSN

1.5.3.1. Sequenciamento de 1ª geração – Tradicional de Sanger

A base molecular da SN começou a ser delineada em 2001, quando mutações em heterozigose no gene *PTPN11* foram encontradas em metade dos indivíduos afetados, indicando haver uma heterogeneidade genética de loco para a síndrome (Tartaglia et al., 2001). O gene *PTPN11* pertence à via de sinalização RAS/MAPK, importante na proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular. As proteínas RAS ativadas promovem uma cascata de reações de fosforilação em RAF-MEK-ERK, com a atuação deste último efetor desempenhando um papel na transcrição de genes no núcleo da célula e também na modulação da função de alvos citoplasmáticos (Roberts et al., 2013) (figura 5). Após cinco anos desta descoberta, variantes em heterozigose em um outro gene (*KRAS*) - também pertencente à via RAS/MAPK - foram associadas à síndrome CFC e SN (Niihori et al., 2006; Schubbert et al., 2006). Este precedente possibilitou a descoberta de diferentes outros genes desta via de sinalização associados à SN e SRSN em um curto espaço de tempo, sendo que a SN é a que apresenta a maior heterogeneidade genética de loco (figura 5, tabela 2). A grande maioria das variantes em heterozigose encontradas é do tipo missense e leva a um ganho de função, com aumento da sinalização da via RAS/MAPK. (Roberts et al., 2013; Aoki et al., 2016). Até 2010, empregando-se a técnica do sequenciamento tradicional de Sanger, os genes novos associados à SN e SRSN, além dos genes *PTPN11* e *KRAS*, incluíam:

SOS1, RAF1, NRAS, SHOC2, CBL, BRAF, MAP2K1, MAP2K2, HRAS (Tartaglia et al., 2011; Aoki et al., 2016).

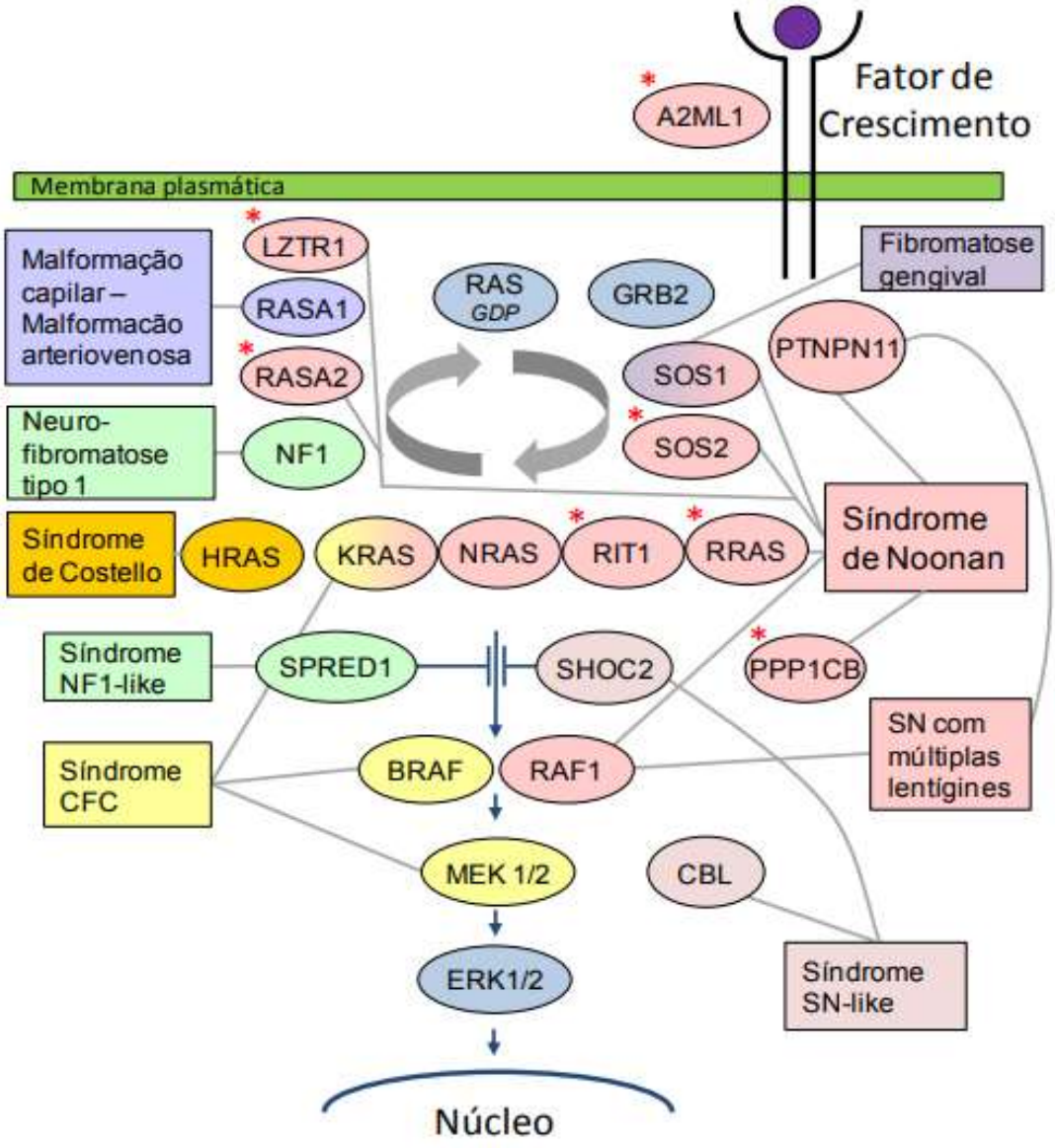

Figura 5: Diagrama esquemático da via de sinalização RAS/MAPK, mostrando os genes associados às diferentes RASopatias. Marcados com asteriscos estão os genes descobertos pelo emprego da técnica de NGS (Adaptado Aoki et al., 2016).

1.5.3.2. Sequenciamento de Nova Geração – Identificação de novos genes associados à SN

A partir de 2013, pela utilização do sequenciamento de nova geração, diversos outros genes foram associados às RASopatias, como os genes *RIT1, RRAS, RASA2, A2ML1, SOS2, LZTR1, PPP1CB, CDC42.* Casos únicos foram associados a variantes nos genes *SPRY1 e MAP3K8* (Aoki et al., 2016; Gripp et al., 2016; Tydman & Rauen, 2016; Martinelli et al., 2018) (tabela 2). Destaca-se que dois destes genes, o *SOS2 e o LZTR1*, foram descobertos por este grupo (Yamamoto et al., 2015) sendo que o gene *LZTR1*, de função pouco conhecida, não era previamente reconhecido como parte integrante da via de sinalização RAS/MAPK. O emprego da técnica do sequenciamento de nova geração, aliado à estratégia de estudar casos familiais, possibilitou demonstrar seu papel na etiologia da SN. Recentemente, dois estudos empregando diversos modelos funcionais comprovaram o papel do gene *LZTR1* como um regulador da ubiquitinação da proteína RAS (Bigenzahn et al., 2018; Steklov et al., 2018). Dentre os genes descritos pela técnica do NGS, o gene *RIT1* destaca-se pela sua frequência nas casuísticas estudadas, sendo atualmente considerado como um dos principais genes associados à SN, responsável por aproximadamente 5% dos casos, atrás dos genes *PTPN11* (aproximadamente 50% dos casos), *SOS1* (18%) e *RAF1* (11%) (Kouz et al., 2016). Em 2018, Johnston et al. estudaram uma casuística composta de 12 famílias, com ou sem consanguinidade, com recorrência da SN em irmãos, cujos pais eram fenotipicamente normais, compatível com um padrão de herança autossômico recessivo. Nestas famílias, os afetados pela SN possuíam variantes bialélicas em *LZTR1*, tanto do tipo missense, como também variantes de perda de função. Uma das explicações aventadas pelos autores sugere que o mecanismo pelo qual o fenótipo pode se expressar com a presença de variantes em uma ou duas cópias do gene seria aquele no qual haveria uma redução funcional da proteína abaixo de 50%, seja por um efeito dominante negativo, no caso de uma única variante, seja pela presença de um alelo de perda de função e outro hipomórfico, no caso de variantes bialélicas. A presença de duas variantes de perda de função no camundongo é incompatível com a vida, o que parece também ser o caso no ser humano. Como alternativa, a posição da variante no gene poderia explicar a necessidade de uma ou duas variantes para a expressão do fenótipo. A

descoberta de raros casos de SN compatíveis com um padrão autossômico recessivo tem implicações claras para o aconselhamento genético, particularmente em casos isolados em famílias sem consanguinidade, uma vez que, caso se comprove a presença de variantes bialélicas, o risco de recorrência para os genitores desta criança passa a ser de 25%. Este risco é substancialmente maior que aquele fornecido para os genitores de um indivíduo com a SN e variante em apenas uma cópia do gene. Nesta eventualidade, o risco é menor que 1%, levando-se em consideração a possibilidade de um mosaicismo gonadal, o que foi reportado raramente na síndrome (Elalaoui et al., 2010). Por outro lado, para o indivíduo afetado pela SN portador de uma variante em heterozigose, o risco para a sua prole é de 50%.

Tabela 2: Caracterização clínica e genética da SN e das SRSN. Aoki et al., 2016; Gripp et al., 2016; Tydman & Rauen, 2016; Martinelli et al., 2018.

Síndrome	**Principais manifestações clínicas**	**Anormalidade genética Gene/loco**
Síndrome de Noonan **(SN)** **OMIM 163950**	Baixa estatura; dismorfismos faciais; pescoço curto e/ou alado; deformidade torácica; cardiopatia congênita; deficiência intelectual variável; diátese hemorrágica.	*PTPN11*-12q24.1; *SOS1*-2p22.1; *RAF1*- 3p25.1; *KRAS*-12p12.1; *NRAS* - 1p13.2; *RRAS* - 19q13.33; *BRAF*-7q34; *MAP2K1*-15q22.31; *RIT1* – 1q22; *RASA2* – 3q23 *A2ML1* – 12p13.31 *SOS2* - 14q21.3; *LZTR1* - 22q11.21 *CDC42* - 1p36.12
Síndrome de Noonan com múltiplas lentigines **(SNML)** **OMIM 151100**	Manchas lentiginosas, alterações eletrocardiográficas de condução, hipertelorismo ocular, estenose pulmonar, alterações na genitália, baixa estatura e surdez.	*PTPN11*-12q24.1; *RAF1*- 3p25.1; *BRAF*-7q34

Síndrome de Costello **(SC)** **OMIM 218040**	Cabelos encaracolados e esparsos, peso elevado ao nascimento, face com traços grosseiros, papiloma perinasal, hiperpigmentação cutânea difusa; deficiência intelectual	*HRAS*-11p15.5
Neurofibromatose tipo 1 **(NF1)** **OMIM 162200**	Lesões cutâneas hiperpigmentadas (manchas café com leite, efélides axilares e inguinais), neurofibromas plexiformes/ subcutâneos; glioma do nervo óptico; anomalias esqueléticas específicas, como o encurvamento da tíbia com ou sem pseudoartrose e dificuldade de aprendizagem, predisposição maior a tumores	*NF1*- 17q11.2
Síndrome de Legius **(SL)** **OMIM 611431**	Lesões cutâneas hiperpigmentadas (manchas café com leite e efélides), dismorfismos faciais, macrocefalia, dificuldade de aprendizagem ou déficit de atenção, lipomas	*SPRED1 – 15q14*
Síndrome cardiofaciocutânea **(CFC)** **OMIM 115150**	Baixa estatura; anormalidades ectodérmicas; cardiopatia congênita; deficiência intelectual variando de moderada à grave e características faciais semelhantes à SN	*BRAF*-7q34; *MAP2K1*-15q22.31*;* *MAP2K2* - 19p13.3; *KRAS*- 12p12.1;
Síndrome Noonan-like com cabelos anágenos frouxos **(SNLCAF)** **OMIM 607721**	Cabelos lisos e de crescimento lento; características faciais semelhantes à SN; baixa estatura; cardiopatia, principalmente da valva mitral; macrocefalia relativa e malfromação de Chiari	*SHOC2* - 10q25.2; *PPP1CB* - 2p23.2

1.6. Sequenciamento de Nova Geração – Teste diagnóstico na SN

O estudo conjunto dos diferentes genes associados às SN confere uma positividade ao redor de 70-80% dos casos, mostrando que ainda não há um conhecimento completo das bases moleculares na síndrome. (Aoki et al., 2016).

O sequenciamento direcionado (targeted sequencing) tem uma grande aplicação no caso de doenças monogênicas que apresentam grande heterogeneidade genética, como é o caso da SN. É comum estes painéis englobarem todos os genes conhecidos associados às diferentes RASopatias, como pode ser observado a seguir nos estudos publicados na literatura.

Lepri et al. (2014) utilizaram o sequenciamento direcionado em um casuística de seis pacientes com diagnóstico molecular confirmado e quatro controles negativos para validar a plataforma MiSeq® (Illumina, San Diego, CA) composta pelos genes *PTPN11, SOS1, RAF1, BRAF, HRAS, KRAS, NRAS, SHOC, MAP2K1*, *MAP2K2,* e *CBL*. Neste estudo, todos os pacientes com mutação prévia foram corretamente diagnosticados pela nova técnica. Também foram avaliados 80 pacientes com suspeita clínica de alguma RASopatia, sendo encontradas 38 variantes nestes pacientes (47,5%), incluindo os genes *PTPN11* (22/38 = 58%), *SOS1* (9/38 = 23%), *BRAF* (2/38 = 5%), *MAP2K2* (2/38 = 5%), *RAF1* (2/38 = 5%) e *CBL* (1/38 = 3%). Uma vez que não obtiveram resultados falso-positivos ou falso-negativos, os autores concluíram que esta técnica era uma boa ferramenta diagnóstica, com boa acurácia e de fácil análise.

Bhoj et al. (2016) analisaram os dados obtidos de 126 indivíduos com RASopatias, que realizaram NGS para um painel de genes associados a estas doenças (*BRAF, CBL, HRAS, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, PTPN11, RAF1*, *SHOC2, SOS1 e SPRED1*) no Children's Hospital na Filadélfia, Estados Unidos, entre julho de 2013 e dezembro de 2014. Foram encontradas variantes consideradas patogênicas em 24 indivíduos (19%) nos genes *PTPN11* (71%), *SOS1* (13%), *MAP2K* (8%) e *RAF1* (8%) e variantes consideradas de significado incerto (VUS) em nove pacientes (6%). Os achados clínicos que foram significativamente associados a um teste molecular positivo incluem a presença da estenose pulmonar ou outra anomalia cardíaca associada e a ptose palpebral.

Em 2016, Čizmárová et al. avaliaram 51 indivíduos na Europa Central de 45 famílias com diagnóstico de uma RASopatia, 41 deles com características da SN.

Destes, em 22, 19 com o diagnóstico clínico da SN e 3 com cardiofaciocutâneo, o sequenciamento por um painel de genes (*PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS, BRAF*, *NRAS, HRAS, MAP2K1, MAP2K2, SHOC2, CBL, SPRED1* e *NF1*) foi realizado e no restante, sequenciamento tradicional de Sanger. A positividade total na casuística foi de 69% (35/51), sendo cinco deles diagnosticado por NGS.

Em 2018, Tafazoli et al. avaliaram 15 pacientes iranianos com diagnóstico clínico de uma RASopatia e, após realizaram sequenciamento tipo Sanger para o gene *PTPN11*, prosseguiram a investigação com um painel contendo os seguintes genes: *A2ML1, BRAF, CBL, HRAS, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, PTPN11*, *RAF1, RIT1, SHOC2, SOS1* e *SPRED1*. Quatro indivíduos apresentavam variantes em heterozigose no gene PTPN11 (3 deles com a variante mais comum na SN, p.N308D), 2 em *SOS1*, 1 em *KRAS* e *CBL*. Todas as variantes eram de novo, com exceção da variante encontrada em *CBL*, herdada da mãe aparentemente não-afetada. Três variantes são novas: p.D155N no gene *PTPN11*, p.L53W no gene *KRAS* e p.I1302V no gene *SOS1*.

Em 2019, em Singapura, foi empregado o sequenciamento de nova geração para um painel contendo 16 genes (*PTPN11, NF1, BRAF, KRAS, NRAS, HRAS, SOS1, RAF1, SHOC2, CBL, RIT, MAP2K1, MAP2K2, SPRED1* e *RASA1*) em uma casuística de 17 pacientes com SN. Foram encontradas variantes em heterozigose em 13 deles (76%), sendo 8 no gene *PTPN11*, 3 no gene *SOS1* e 1 no gene *RIT1* e *KRAS.*

Em alguns raros casos, CNVs envolvendo genes da via de sinalização RAS/MAPK foram encontradas em pacientes com características sugestivas das RASopatias, embora o fenótipo não fosse típico. Entre eles, duplicações do segmento cromossômico 12q24.13, incluindo o gene *PTPN11*, foram encontrados em pacientes com fenótipo da síndrome de Noonan. Outras duplicações envolvendo os genes *SHOC2, RAF1 e MAP2K2*, assim como deleções englobando os genes *BRAF* e *MAP2K2* também foram encontradas em pacientes com fenótipos de uma RASopatia (Tydman & Rauen, 2016).

1.7. Correlação genótipo-fenótipo

Embora não haja uma correlação genótipo-fenótipo precisa na SN, algumas características clínicas são mais prevalentes em determinados grupos: pacientes

que apresentam variantes no gene *PTPN11* apresentam uma maior prevalência de estenose pulmonar valvar; o gene *RAF1* está mais associado à miocardiopatia hipertrófica; no gene *SOS1*, observa-se uma menor frequência de baixa estatura e deficiência intelectual, mas um maior envolvimento ectodérmico e ptose palpebral e nos pacientes com mutações no gene *KRAS*, o envolvimento cognitivo é maior e mais frequente (Tartaglia et al, 2002; Pandit et al, 2007; Zenker et al., 2007a,b).

Pacientes com variantes em *RIT1* apresentam características craniofaciais compatíveis com o diagnóstico da síndrome de Noonan, dentre as RASopatias. Observa-se também uma alta prevalência de anormalidades pré e perinatais, como o aumento da translucência nucal, polidrâmnio, hidropsia fetal e derrames intracavitários em aproximadamente 50% dos casos. Anomalias linfáticas após o período neonatal também podem ocorrer, como linfedema de membros inferiores, quilotórax, linfangiectasia intestinal. A grande maioria dos pacientes apresenta anomalias cardíacas e, embora a estenose pulmonar valvar seja a alteração mais frequente, a cardiomiopatia hipertrófica é bastante comum, presente em mais de 40% das casuísticas. Já a presença de baixa estatura foi observada em 1/3 e a deficiência intelectual/dificuldade escolar em aproximadamente 1/4 dos casos. Alterações ectodérmicas e diátese hemorrágica não são comuns (Yaoiata et al., 2016; Kouz et al., 2016). Shingo et al (2019) forneceram evidências importantes de que a mutação p.A57G no gene *RIT1* causa hipertrofia cardíaca, fibrose e outras características associadas à SN por meio de um mecanismo relacionado à via de sinalização do AKT. Embora o mecanismo detalhado permaneça desconhecido, este estudo fornece uma nova perspectiva para o tratamento da cardiomiopatia associada à SN.

Em 2019, Pagnamenta et al. analisaram variantes em *LZTR1* em uma casuística de 9.624 pacientes que realizaram sequenciamento do exoma por anomalias de desenvolvimento e em oito casos de pacientes com fenótipo Noonan já triados para os genes comuns na síndrome, encontrando 12 indivíduos com alterações em uma ou nas duas cópias do gene *LZTR1*. Os dados clínicos obtidos deste estudo, associados aos da literatura, mostraram que a cardiomiopatia hipertrófica foi descrita em 5/26 (19%) pacientes com variantes em heterozigose em *LZTR1* e em 19/26 (73%) naqueles com variantes bialélicas, sugerindo um aumento desta cardiopatia na forma autossômica recessiva (Tabela 3).

Tabela 3: Correlação genótipo-fenótipo entre genes associados à síndrome de Noonan.

Gene	Principais manifestações clínicas	Referência
PTPN11	Estenose pulmonar valvar	Tartaglia et al, 2002a; Zenker 2004)
RAF1	Cardiomiopatia hipertrófica	kobayashi et al., 2010 e Pandit et al., 2007
SOS1	Menor frequência de baixa estatura e deficiência intelectual, mas um maior envolvimento ectodérmico e ptose palpebral	Tartaglia et al., 2007 e Zenker et al., 2007b
KRAS	Envolvimento cognitivo é maior e mais frequente	Zenker *et al.,*2007a
RIT1	Apresentam características craniofaciais compatíveis com o diagnóstico da síndrome de Noonan; anomalias cardíacas	Yaoiata et al., 2016; Kouz et al., 2016
LZTR1	Cardiomiopatia hipertrófica (variantes bialélicas)	Pagnamenta *et al.*, 2019)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

Avaliar as características clínicas e as bases moleculares responsáveis pela síndrome de Noonan e síndromes relacionadas à síndrome de Noonan (RASopatias).

2.2. Objetivos Específicos

1. Identificar variantes raras em genes da via RAS/MAPK já associados às RASopatias.
2. Identificar novo(s) gene(s) que possa(m) ser responsável(is) pelas RASopatias.
3. 3. Estabelecer uma associação entre o genótipo e o fenótipo nas RASopatias.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram incluídos 104 pacientes com diagnóstico clínico inicial de uma RASopatia: 87 com diagnóstico da SN, 10 com CFC, 4 com Costello, 2 com SNLLAH (Tabela 4 e 5).

Indivíduos com SN vêm sendo avaliados quanto à presença de uma alteração gênica desde 2002 na Unidade de Genética do Instituto da Criança, logo após a descoberta do primeiro gene responsável pela síndrome. Com o passar dos anos e a descoberta de novos genes associados às RASopatias, o sequenciamento de Sanger continuou a ser realizado em regiões de hotspots dos genes, particularmente para indivíduos com SN. Em 2012, foi possível avaliar indivíduos pelo sequenciamento de nova geração na tentativa de contribuir para a identificação de novos genes responsáveis pela SN. Desta forma, parte da casuística incluída no presente estudo já estava em acompanhamento no Ambulatório de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, alguns com uma análise molecular parcial através do sequenciamento tradicional de Sanger (genes *PTPN11, SOS1, KRAS, RAF1*), mas ainda sem identificação da variante responsável pelo seu fenótipo e outros foram incluídos no sequenciamento do exoma realizado em 2012 para identificação de genes novos. Estes pacientes foram reanalisados para avaliação dos genes já associados às RASopatias até o momento presente. Os pacientes novos incluídos neste estudo não apresentavam estudos moleculares prévios.

A avaliação foi realizada através de uma história clínica, de um exame físico completo e exames complementares para avaliação de achados observados nas RASopatias: ecocardiograma e avaliação da hemostasia sanguínea. Baixa estatura foi definida como uma medida abaixo do percentil 5 no gráfico de altura-idade elaborada pelo Center for Disease Control and Prevention – CDC: http:www.cdc.gov/growthcharts.

O diagnóstico clínico dos pacientes com hipótese clínica inicial da SN foi baseado nos critérios clínicos estabelecidos por van der Burgt et al. (1994) (Tabela

4). Se o indivíduo preenchia os critérios clínicos, foi considerado como típico. Caso não preenchesse, o caso foi considerado atípico.

Tabela 4: Critérios de diagnóstico da SN (Van der Burgt et al , 1994).

Características Clínicas	**A= Maior**	**B= Menor**
Face	Típica	Sugestiva
Coração	EPV e/ou ECG típico	Outro defeito cardíaco
Estatura	<3º percentil	<10º percentil
Tórax		
	Pectus carinatum/ excavatum	Tórax Largo
História familiar		
	Parente de 1º grau com Diagnóstico definitivo de SN	Parente de 1º grau com Diagnóstico sugestivo de SN
Outros		
	Presença de: déficit intelectual + criptorquidia + displasia linfática	Presença de: déficit intelectual ou criptorquidia ou displasia linfática

O indivíduo é considerado afetado pela SN, se apresentar o critério maior fáceis típico associado a mais um critério maior ou dois menores. Se o fácies for sugestivo (critério menor), há necessidade da presença de mais dois critérios maiores ou três menores.

Tabela 5: Pacientes com hipótese diagnóstica de uma RASopatia incluídos neste estudo.

Família/Probando	Registro	Gênero	Data de nascimento	Data 1a avaliação	Hipótese clínica inicial	Critérios de van der Brugt et al. 1994
1	CC722	M	30/12/1986	26/09/1994	Noonan	T
2	CC1169	M	14/05/2002	25/09/2003	Noonan	T
3	F11963-1	M	14/09/2016	11/09/2018	Noonan	T
4*	CC4902	F	25/04/1991	18/06/2008	Noonan	T
5.1*	F11868-1	F	03/11/2011	27/07/2018	Noonan	T
6	F9755-1	F	29/11/2010	11/07/2014	Noonan	T
7	F12100-1	F	09/01/2016	11/01/2019	Noonan	T
8**	CC726	F	01/07/1996	28/01/1999	Noonan	T
9	F10838-1	M	23/09/2014	16/06/2016	Noonan	T
10	F11391-1	M	10/12/2001	15/07/2016	Noonan	T
11	CC5458	M	23/03/2009	05/09/2011	Noonan	T
12	CC5407	M	19/03/2007	01/11/2011	Noonan	T

13	F11621-1	F	31/12/2015	26/05/2017	Noonan	T
14	F12101-1	F	05/08/2015	11/01/2019	Noonan	T
15	CC2016	M	13/07/1999	12/09/2004	Noonan	T
16	F11962-1	F	20/05/2003	11/09/2018	Noonan	T
17	CC5680	M	22/03/2012	08/02/2013	Noonan	T
18.1*	F11303-1	F	29/08/2016	03/03/2017	Noonan	T
19.1*	F10782-1	M	04/09/1999	05/09/2014	Noonan	T
20*	CC5657	F	29/01/2002	26/11/2012	Noonan	T
21	CC5530	M	30/03/1988	28/05/2012	Noonan	T
22	F11276-1	M	31/01/2013	27/01/2017	Noonan	T
23	CC1158	M	17/12/1985	18/07/2002	Noonan	T
24	CC3770	F	17/08/1988	11/10/2005	Noonan	T
25	CC4388	M	07/01/2005	09/11/2006	Noonan	T
26	F12047-1	M	13/08/2016	14/12/2018	Noonan	T

27	CC5608	M	19/06/2009	14/09/2012	Noonan	T
28	F11541-1	M	04/10/2013	02/10/2017	Noonan	T
29	F11869-1	M	10/01/2015	27/07/2018	Noonan	T
30	CC5746	F	07/11/2013	02/10/2014	Noonan	T
31.1*	F10785-1	F	20/04/2016	09/03/2017	Noonan	AT
32	F10286-1	M	04/03/2003	10/02/2015	Noonan	T
33	F10303-1	M	24/12/2014	26/09/2016	Noonan	T
34	F10577-1	M	26/05/2010	28/05/2015	Noonan	T
35	CC5661	F	18/09/2012	18/12/2012	Noonan	T
36	F10167-1	F	01/06/2015	14/08/2015	Costello	
37.1*	CC5100	M	30/06/1986	31/10/1991	Noonan	T
38	CC4602	F	02/10/2000	18/11/2002	CFC	
39	F11444-1	F	04/11/2011	19/06/2017	Noonan	AT
40	CC883	M	18/09/1998	01/07/1999	Noonan	T

41	F10275-1	F	04/02/2003	29/09/2015	SNLLAH	
42	F10280-1	M	24/08/2011	10/06/2015	Costello	
43	F10178-1	F	27/11/2013	17/07/2015	Costello	
44	F9713-1	M	26/09/2011	19/09/2014	Costello	
45	CC2492	M	24/05/1995	03/07/2005	Noonan/CFC	
46	CC893	F	10/09/1989	05/09/1991	CFC	
47	F11874-1	F	23/09/2007	17/06/2008	Noonan/CFC	
48	F11620-1	M	18/03/2003	14/07/2017	noonan	T
49	F11108-1	F	18/07/2012	26/05/2014	CFC	
50	CC5731	F	24/12/2009	06/10/2011	Noonan/CFC	
51	F9186	M	26/02/2008	25/04/2014	CFC	
52	CC5059	F	16/04/2009	02/07/2019	Noonan	T
53	F11961-1	F	20/01/2017	11/09/2018	CFC	
54	F10261-1	F	20/06/2002	22/09/2015	CFC/Costello	

55	11839-1	F	23/03/2007	10/10/2013	CFC	
56	CC5105	M	26/09/2005	07/02/2009	NF1	
57	CC5088	M	08/05/2008	15/07/2009	NF1	
58.1*	F10159-1	M	23/10/2009	31/08/2011	NF1/Noonan	
59.1*	F12102-1	M	24/06/2013	11/01/2019	NF1	
60	CC5072	M	22/11/2002	07/06/2009	Noonan/anomalias vascular	AT
61	CC5217	M	11/10/2004	10/10/2008	Noonan	T
62.1	F11522-1	M	06/12/2016	12/09/2017	Noonan	T
63.1	F10557-1	M	17/03/2005	03/10/2008	Noonan	T
64	CC5114	M	20/07/1999	01/10/2009	Noonan	T
65	CC5305	M	09/11/2007	26/11/2009	CFC	
66	CC1471	M	17/09/2003	29/07/2004	Noonan	AT
67	F11994-1	F	12/10/2012	19/10/2018	SNLLAH	
68	F10600-2	M	21/01/2001	10/07/2004	CFC	
69	CC2207	M	24/12/2004	20/01/2005	Noonan	T

70	3682	F	24/12/2003	03/08/2005	Noonan	AT
71	3324	F	26/09/1990	19/02/2004	Noonan	AT
72**	1547	F	14/06/1995	27/05/2004	Noonan	AT
73	1246	F	15/11/2000	31/03/2001	Noonan	T
74	5260	M	23/02/2005	29/07/2010	Noonan	T
75	5200	M	17/06/2009	19/04/2010	Noonan	T
76	1264	M	21/01/1980	05/01/2006	Noonan	T
77	962	F	31/01/2002	05/12/2002	Noonan	T
78	5198	F	26/12/2008	19/04/2010	Noonan	AT
79	5284	M	15/01/2004	01/10/2004	Noonan	AT
80	4051	M	14/10/1991	16/03/2006	Noonan	AT
81	4621	M	07/03/2001	17/01/2007	Noonan	AT
82	963	F	07/10/1991	21/11/2002	CFC	
83	5097	M	21/08/2005	10/08/2009	Noonan	AT
84	5299	M	10/07/1995	15/10/2010	Noonan	T
85	5119	M	19/03/2003	09/11/2009	Noonan	T
86	5064	M	20/03/2004	28/08/2008	Noonan	T
87	3533	M	05/04/2005	04/08/2005	Noonan	AT

88	884	F	07/11/1991	03/03/1998	Noonan	AT
89	804	M	17/05/1991	23/05/2002	Noonan	AT
90	5120	M	04/01/1993	29/01/2009	Noonan	AT
91	5071	M	02/07/2003	08/06/2009	Noonan	AT
92	5308	M	15/04/1994	15/02/2001	CFC	
93	3546	M	23/02/2004	22/08/2005	Noonan	AT
94	1980	M	25/08/2000	25/11/2004	Noonan	T
95	4565	M	01/08/1997	02/02/2006	Noonan	AT
96	5035	M	02/01/2007	18/02/2009	Noonan	AT
97	1155	M	22/12/2002	22/03/2003	Noonan	T
98	5188	M	14/09/2007	09/12/2009	Noonan	AT
99	4996	M	19/04/2007	26/11/2008	Noonan	AT
100	1413	M	22/11/1994	27/08/2001	Noonan	T
101	5744	M	04/05/2011	26/07/2013	Noonan	AT
102	5336	M	18/08/2000	16/12/2010	Noonan	T
103	F11870-1	M	11/05/2015	02/09/2016	Noonan	AT
104	5747	M	07/12/2000	28/11/2013	Noonan	AT

3.2. Aspectos Éticos

Os pacientes foram incluídos nesse projeto de pesquisa após a assinatura, pelo próprio paciente ou por seu representante legal, do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) nº 0843/08 e Plataforma Brasil (CAAE: 87552118.6.0000.0068), com inclusão da aluna pela Comissão em carta datada de 25/09/2012.

3.3. Métodos

As técnicas empregadas neste estudo incluem particularmente o sequenciamento de nova geração e o sequenciamento tradicional de Sanger, como complementação. Os experimentos envolvidos nesse projeto foram realizados no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O sequenciamento de nova geração foi implementado neste Centro em 2012, sendo, portanto, um laboratório com experiência e validação das técnicas empregadas.

3.3.1. Extração do DNA genômico de linfócitos periféricos

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes e familiares selecionados.

Para as amostras coletadas até 2012, o DNA foi extraído através da técnica proposta por Miller; et al, 1988. A partir de 2012, as amostras foram processadas por uma extração automática QIAsymphonycom o kit de extração de DNA da própria Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A quantificação e avaliação da pureza do DNA das amostras foi realizada no aparelho NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA).

3.3.2. Sequenciamento de Nova Geração NGS

O sequenciamento de nova geração nos probandos foi realizado ou utilizando-se um painel de genes associados às RASopatias ou pelo sequenciamento do exoma, a depender da disponibilidade do laboratório, utilizando-se as plataformas MiSeq (painel de genes) e HiSeq (sequenciamento do exoma) da Illumina (Illumina, San Diego, Califórnia, EUA).

Os genes incluídos no painel a partir de 2014 para as RASopatias foram: *BRAF, CBL, HRAS, KRAS, LZTR1, MAP2K1, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11, RAF1, RIT1, SHOC2, SOS1, SOS2* e *SPRED1* (Tabela 6).

Tabela 6: Genes incluídos no painel para as RASopatias e suas taxas de cobertura respectivamente.

	Cobertura	
Gene	**>10x (%)**	**>20x (%)**
BRAF	99,99	99,53
CBL	100	100
HRAS	100	100
KRAS	100	100
LZTR1	99,99	99,96
MAP2K1	100	99,87
MAP2K2	100	100
NF1	100	99,6
NRAS	100	100
PTPN11	100	100
RAF1	100	99,86
RIT1	100	100
SOCH2	100	99,8
SOS1	100	99,95
SOS2	99,95	99,63
SPRED1	100	100

A fragmentação do DNA foi realizada inicialmente via ultrassom com uso de sonicador Covaris (Covaris, Inc., Woburn, Massachusetts, USA) e, após 2012, por método enzimático.

Para o preparo das bibliotecas foram seguidas as recomendações dos kits fornecidos pelos fabricantes. Para os kits da empresa Illumina, as amostras foram preparadas em lotes de 12 e no caso do sequenciamento do exoma para a empresa Agilent, as amostras foram preparadas individualmente e posteriormente agrupadas. Os kits de captura utilizados para o sequenciamento de painel foram majoritariamente um kit Illumina Nextera XT customizado com aproximadamente 500 genes de interesse clínico (sendo 16 para RASopatias) e o kit Illumina TruSightOne expanded (6700 genes de interesse Clínico – Illumina). Os kits de captura utilizados para o sequenciamento do exoma variaram ao longo do tempo, sendo o principal o Illumina Nextera Rapid Capture Expanded Exome Kit, com 62Mb de região alvo, incluindo todos os exons codificantes e regiões não-traduzidas (UTRs) dos genes incluídos no RefSeq. Em algumas ocasiões o kit Illumina TruSeq exome enrichment (com região alvo de 45Mb, que não inclui UTR) e, após 2016, o kit Agilent SureSelect Human All Exon V6 (com região alvo de 60Mb) também foram empregados.

As amostras foram então quantificadas pelo kit High Sensitivity DNA Analysys do Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), e porqPCR no instrumento LightCycler 480 (Roche - F. Hoffmann–La Roche AG, Basileia, Suíça), utilizando kits da empresa Kapa, KAPA SYBR FAST (Kapa Biosystems, subsidiária da Roche - F. Hoffmann–La Roche AG Basileia, Suíça), diluídas para 4nM e injetadas na quantidade de 17 a 20pMol nos sequenciadores Illumina para a etapa de clusterização.

As amostras foram sequenciadas de acordo com os protocolos de sequenciamento da empresa Illumina para obter sequências pareadas (paired-end) de tamanho 100x100 a 300x300 pares de bases (Illumina – TruSeq library preparation, TruSeq exome enrichment, TruSeq custom enrichment, Nextera Rapid Capture Expanded Exome Kit, Agilent SureSelect Human All Exon V6, MiSeq sequencing by synthesis, HiSeq sequencing by synthesis, Paired-End Cluster Generation). A clusterização das amostras corridas no MiSeq ou HiSeq modo ‘Rapid’ foi realizada no próprio sequenciador, enquanto a clusterização das amostras de

seqüenciamento do exoma realizadas no HiSeq modo ‘High Output’ foi realizada no cBot (robô de clusterização da própria Illumina).

Na etapa da análise de bioinformática, as sequências geradas foram transformadas no formato fastq pelosequenciador ou em servidores com software disponibilizado pela empresa fabricante da máquina de sequenciamento (Illumina Bcl2Fastq – HiSeq). Essas sequências foram alinhadascom softwares bwa (Burrows-Wheeler-Aligner) ou bwa-mem (Li & Durbin, 2009) com a referência humana hg19, gerando arquivos SAM (Sequence Alignment Map). A conversão de SAM paraBAM (Binary Alignment Map) foi feita com o programa picard (http://broadinstitute.github.io/picard), sendo marcadas as sequências provavelmente geradas por duplicatas de PCR (mark duplicates). A identificação de variantes de ponto e inserções/deleções foi realizada com o programa Haplotype Caller do pacote GATK (Genome Analisys Tool Kit) do instituto Broad (McKenna et al., 2010), o qual permite realinhamentos e recalibrações da qualidade das bases sequenciadas. As variantes encontradas foram disponibilizadas em um arquivo do tipo Variant call format – VCF –, anotadas com o programa Annovar (Wang et al., 2010), com dados públicos de ferramentas biológicas e dados populacionais para posterior análise em planilhas de Excel.

3.4. Critérios para análise das variantes

A análise no NGS (painel ou sequenciamento do exoma) foi direcionada inicialmente para os genes da via RAS/MAPK já associados às RASopatias, seguindo os seguintes critérios na filtragem das variantes de ponto e pequenos indel genômicos em cada paciente:

1. Variante não-sinônima com frequência alélica em populações controles menor ou igual a 1%
   1.1. Exac: http://exac.broadinstitute.org/
   1.2. Gnomad: https://gnomad.broadinstitute.org/
   1.3. População brasileira – Arquivo Brasileiro Online de Mutações: http://abraOM.ib.usp.br
2. Ferramentas in silico disponíveis de forma gratuita na web para avaliar o impacto de uma variante em seu produto protéico. Foram considerados os resultados que

sugerem dano à proteína em regiões conservadas evolutivamente, com concordância na maioria das seguintes ferramentas:

2.1. Mutation Taster: http://www.mutationtaster.org/

2.2. Sift: https://sift.bii.a-star.edu.sg/

2.3. Likelihood ratio test – LRT

2.4. Deep neural network (DNN) algorithm – DANN

2.5. Genomic Evolutionary Rate Profiling – GERP

3. Presença de uma variante em heterozigose para o padrão de herança autossômico dominante e duas variantes em heterozigose composta ou homozigose para o padrão de herança autossômico recessivo (no caso do gene *LZTR1*).

As variantes encontradas foram classificadas de acordo com critérios propostos da ACMG de acordo com os quadros 1 e 2. Destas, foram consideradas variantes causativas do fenótipo aquelas classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas.

Foram consideradas variantes novas, não reportadas anteriormente, aquelas ausentes nos bancos de dados públicos: ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) e The Human Gene Mutation Database – HGMD (http://www.hgmd.cf.ac.uk/).

Nos casos não-típicos para uma RAsopatia, nos quais nenhuma variante foi encontrada nos genes associados, análise de variantes consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas, já associadas a outros fenótipos mendelianos, foram consideradas como possíveis responsáveis pelo fenótipo e as características clínicas reanalisadas.

Em dois casos isolados e sem consanguinidade (F10557-1 e F10600-2), após a realização do exoma do probandos e sem identificação de uma variante que pudesse explicar o fenótipo destes indivíduos, foi realizado o exoma dos genitores, para auxiliar a filtragem de variantes *de novo* ou em heterozigose composta nos probandos, na tentativa de identificar genes novos responsáveis por uma RASopatia.

Quadro 1: Classificação de variantes segundo os critérios* da ACMG 2015**

Patogênica

1 Muito Forte (PVS1) *E* ≥ 1 Forte (PS1–PS4) *OU*

≥2Moderada (PM1–PM6) *OU*

1Moderada (PM1–PM6) *E* 1 Suporte (PP1–PP5) *OU*

≥2 Suporte (PP1–PP5)

≥2Forte (PS1–PS4) *OU*

1Forte (PS1–PS4) *E* ≥3 Moderada (PM1–PM6) *OU*

2Moderada (PM1–PM6) *E* ≥2 Suporte (PP1–PP5) *OU*

1 Moderada (PM1–PM6) *E* ≥4 Suporte (PP1–PP5)

Provavelmente Patogênica

1Muito Forte (PVS1) *E* 1 Moderada (PM1–PM6) *OU*

1Forte (PS1–PS4) *E* 1–2 Moderada (PM1–PM6) *OU*

1 Forte (PS1–PS4) *E* ≥2 Suporte (PP1–PP5) *OU*

≥3Moderada (PM1–PM6) *OU*

2Moderada (PM1–PM6) *E* ≥2 Suporte (PP1–PP5) *OU*

1 Moderada (PM1–PM6) *E* ≥4 Suporte (PP1–PP5)

Benigna

1 Suficiente por si só (BA1) *OU*

≥2 Forte (BS1–BS4)

Provavelmente Benigna

1 Forte (BS1–BS4) E 1 Suporte (BP1–BP7) *OU*

≥2Suporte (BP1–BP7)

Variante de Significado Incerto/Indeterminado

(*Variant of Unknown/Uncertain Significance*) (VUS)

Nenhum dos acima

Quadro 2: Classificação de variantes segundo os critérios* da ACMG 2015**

	Benigna			Patogênica			
	Suficiente por si só	Forte	Suporte	Suporte	Moderada	Forte	Muito Forte
Dados Populacionais	MAF (*minor allele frequency*) > 5% em controles *BA1*	MAF muito alto para doença *BS1* **OU** observação nos controles inconsistente com a penetrância da doença *BS2*			Ausente nos bancos de dados populacionais *PM2*	Prevalência nos afetados estatisticamente maior que nos controles *PS4*	
Dados Computacionais e Preditivos			Múltiplos programas de predição *in silico* sugerem que não há impacto no gene/proteína *BP4* *Missense* em um gene onde apenas truncante causa doença *BP1* Sinônima sem predição de alterar *splicing BP7*	Múltiplos programas de predição in silico sugerem que há efeito deletério no gene/proteína *PP3*	Missense nunca descrita no mesmo resíduo de aminácido de uma variante missense já estabelecida como patogênica *PM5* Variante altera o comprimento da proteína *PM4*	Troca de mesmo aminácido que em uma variante já estabelecida como patogênica *PS1*	Variante predita como nula em um gene onde perda de função é sabidamente mecanismo de doença *PVS1*
Dados Funcionais		Estudos funcionais bem estabelecidos não mostram perda de função *BS3*				Estudos funcionais bem-estabelecidos mostram efeito deletério *PS3*	
Dados de Segregação		Não-segregação com a doença *BS4*		Co-segregação da doença em múltiplos afetados *PP1*	Aumento dos dados de segregação		
Dados *De novo*					De novo (SEM paternidade e maternidade confirmados) *PM6*	De novo (paternidade e maternidade confirmados) *PS2*	
Dados Alélicos			Observada em *trans* com uma variante dominante *BP2* Observada em *cis* com uma variante patogênica *BP2*		Para doenças recessivas, detectada em trans com uma variante patogênica *PM3*		
Outros *Databases*			Fonte confiável (dados privados) = benigno BP6	Fonte confiável = patogênico *PP5*			
Outros dados			Identificada em um caso com uma causa alternativa *BP5*	Fenótipo do paciente ou família específico para o gene *PP4*			

*válidos para doenças monogênicas de penetrância completa

**adaptado de Richards et al., 2015.

3.5. Sequenciamento Sanger

Para o sequenciamento tradicional de Sanger de uma região exônica específica de um determinado gene, foram desenhados pares de *primers* (*forward* e *reverse*) que flanqueiam esta região de interesse. Seguiu-se com a amplificação pela técnica de PCR, com purificação por ExoSAP-IT (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA). Para a reação de sequenciamento propriamente dita utilizou-se oBigDye Terminator (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguida de purificação final em coluna de sílica. O produto foi então injetado no sequenciadorABI3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) para posterior análise pelo software Sequencher(Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, EUA).

Esta técnica foi empregada para:

1. Avaliação de variantes no gene *HRAS*, por ser um gene pequeno, com concentração das variantes no éxon 2 e pelo fenótipo ser mais homogêneo, na maioria das vezes.
2. Avaliação da segregação da variante em familiares, desde que fosse possível obter esse material: presença da mesma variante em heterozigose naqueles casos que seguem um padrão autossômico dominante e com fenótipo de uma RASopatia; ausência da variante nos genitores em casos não familiais, mostrando ser um evento *de novo*; identificação de apenas uma variante em cada genitor naqueles casos com um padrão de herança autossômico recessivo.
3. Na complementação de regiões de interesse não cobertas pelo NGS avaliadas através da ferramenta de visualização *Integrative Genomics Viewer* (IGV).

O estudo do *array* genômico foi realizado em um paciente (F10600-2) para confirmar uma CNV detectada pelo software XHMM em uma reanálise dos dados genômicos pelo Prof. Matsumoto, da Okohama City University, Japão. Este estudo foi realizado no Instituto de Biociências no qual foi empregada a seguinte técnica:as amostras de DNA do probando e seus genitores foram hibridadas em uma lâmina 180K produzida pela Agilent Technologies, previamente customizada no laboratório.

As etapas de fragmentação enzimática, marcação com fluoróforos (cy3 ou cy5), purificação, hibridação e lavagem da lâmina foram feitas de acordo com as recomendações presentes no protocolo da Agilent Technologies. Como controle de qualidade do experimento, foi usado um valor de DLRS (*derivative log ratio spread*) menor ou igual 0.2 e todas as amostras foram testadas duas vezes. O software Agilent Genomic Workbench 7.0 foi usado para chamada de CNVs, utilizando o algoritmo ADM-2 (genoma de referência GRCh37/hg19 e filtro de chamada de alterações “DefaultAberrationFilter_v1”, modificando o valor de log2 para um valor absoluto de 0.3).

3.6. Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva de cada característica clínica com os valores de frequência em número absoluto e relativo. Na comparação entre as frequências das variáveis estudadas utilizou-se o teste exato de Fisher, tendo sido adotado um nível de significância de 5%. Para a realização das análises foi utilizado o software MedCalc versão 17.9.2. Incluiu-se na análise, além da casuística atual, dados clínicos e moleculares de indivíduos previamente avaliados na Unidade de Genética do Instituto da Criança.

4. RESULTADOS

4.1. Análise de pacientes através da plataforma Illumina

Foram avaliados 104 pacientes, 68 do gênero masculino e 36 do feminino, com uma hipótese diagnóstica de uma RASopatia, particularmente a síndrome de Noonan. Em alguns pacientes (CC893, F11620-1, F11108-1, CC5105), os dados clínicos não permitiram realizar uma diferenciação precisa entre a síndrome de Noonan e síndrome de CFC ou Costello.Outros diagnósticos de RASopatias incluíram a síndrome CFC (10 indivíduos), Costello (4), síndrome Noonan-like com cabelos anágenos frouxos (2), neurofibromatose tipo I (4). Um indivíduo apresentava características faciais da síndrome de Noonan associado a anomalias vasculares (probando da família 61).

Para os 79 pacientes com diagnóstico clínico inicial da síndrome de Noonan, a aplicação dos critérios clínicos propostos por van der Burgt et al. (1994) permitiu classificar 54 deles como casos típicos (aqueles que preenchiam os critérios clínicos) e 25 como atípicos (Tabela 5).

Variantes pontuais em heterozigose, classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, em genes da via RAS/MAPK associados às RASopatias foram encontradas em 59 probandos (57%) e seis parentes afetados, com a seguinte distribuição: 28 em *PTPN11*, 2 em *SOS1*, 2 em *RAF1*, 2 em *RIT1*, 3 em *NRAS*, 2 em *KRAS*, 4 em *HRAS*, 7 em *BRAF*, 2 em *MAP2K1*, 2 em *MAP2K2*, 3 em *NF1*, 1 em *RASA1* e 1 em *PPP1CB*. Três variantes eram novas, não reportadas anteriormente, encontradas nos genes *NF1* (CC5088 e F10159-1) e *MAP2K2* (F11839-1). Esta úlitma variante foi avaliada nos genitores e mostrou ser um evento de novo no probando. A variante missense no gene *NF1* (c.4158T>G) segrega com o fenótipo nos familiares avaliados (família F10159-1). Três variantes foram classificadas como de significado incerto nos genes *SOS1* (F10785-1), *NF1* (F12102-1) e *LZTR1* (F11522-1). Os dois primeiros casos eram familiais e a variante segregava com o fenótipo apenas no gene *NF1*. Por outro lado, a variante em *LZTR1* estava presente na genitora considerada não afetada pela SN.

Com exceção de dois irmãos afetados pela síndrome de Noonan, de pais sem a variante, cuja explicação decorre de serem gêmeos provavelmente monozigóticos

(família 19), os casos familiais apresentavam uma transmissão do fenótipo vertical, compatível com um padrão de herança autossômico dominante.

A grande maioria das variantes encontradas era missense. Variantes de perda de função foram observadas em três casos: uma variante nonsense em *NF1* e duas variantes do tipo frameshift em *NF1* e *RASA1*. Em quatro pacientes (CC5744, CC5530, CC5336, F11962-1) com uma hipótese clínica da SN e sem variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes da via RAS/MAPK, a análise pelo IGV mostrou uma cobertura não satisfatória do éxon 8 do gene *PTPN11*. Posteriormente realizou-se o sequenciamento Sanger, possibilitando a identificação da variante no resíduo p.Asn308 nos pacientes CC5530 e F11962-1 (Figura 6 e 7).

Nos pacientes com SN e classificados como típicos, a positividade do sequenciamento foi de 73% (40/55), bem superior ao observado nos casos atípicos (12,5%).

O estudo molecular permitiu estabelecer um diagnóstico mais preciso de uma RASopatia, diferindo da suspeita clínica inicial, em seis casos (F11276-1 (SN para SNML), CC4602 (CFC para SN), F10167-1 (SC para SN), CC883 (SN para CFC), F10275-1 (SNLLAH para SC), CC5059 (SN para CFC).

Em quatro casos isolados, em famílias sem consanguinidade, foram encontradas variantes em genes associados a outros fenótipos mendelianos: variante em heterozigose em *ACTB*, responsável pela síndrome de Baraitser-Winter (OMIM 243310); *KAT6A* e *PACS1*, associados a retardo mental 32 (OMIM 616268) e 17 (OMIM 615009), respectivamente, e variantes em heterozigose composta em *DPH1*, responsáveis pela síndrome de atraso de desenvolvimento, com baixa estatura, dismorfismos faciais e cabelos esparsos (OMIM 616901) (figuras 8, 9, 10 e 11). Em um paciente com fenótipo de uma RASopatia associado à deficiência intelectual acentuada, a análise por um software para análise de CNVs mostrou uma microdeleção de 1,2Mb no cromossomo 19, a qual foi confirmado pelo array genômico (tabela 6).

No total, a confirmação do diagnóstico clínico inicial ou o estabelecimento de um novo diagnóstico pelo NGS foi obtido em 64 indivíduos desta casuística (61,5%).

O exoma do trio em um indivíduo mostrou a presença de uma variante de novo em *ACTC1*, gene associado anteriormente a alterações cardíacas (figura 12).

Tabela 7: Variantes identificadas em 64 probandos utilizando critério da ACMG pela plataforma illumina.

Família	RG probando e familiares	Nucleotídeo	Proteína	Posição	Exon (total)	RefSNP (rs)	Teste genético	CRITERIOS ACMG	CLASSIFICAÇÃO	gnomAD	ABraOM	DANN	GERP	SIFT	LRT	Mutation Taster
***PTPN11*:NM_002834.4**																
1	CC722	c.172A>C	p.(Asn58His)	chr12:g.112888156	3 (16)	rs397507505	exoma	PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
2	CC1169	c.178G>T	p.(Gly60Cys)	chr12:g.112888162	3 (16)	rs397507507	exoma	PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
3	F11963-1	c.184T>G	p.(Tyr62Asp)	chr12:g.112888168	3 (16)	rs121918460	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
4*	CC4902	c.181G>A	p.(Asp61Asn)	chr12:g.112888165	3 (16)	rs397507510	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
5.1*	F11868-1	c.188A>G	p.(Tyr63Cys)	chr12:g.112888172	3 (16)	rs121918459	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	0,00001	NA	D	D	D	D	D
6	F9755-1	c.214G>T	p.(Ala72Ser)	chr12:g.112888198	3 (16)	rs121918453	painel	PS1 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
7	F12100-1	c.215C>G	p.(Ala72Gly)	chr12:g.112888199	3 (16)	rs121918454	exoma	PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
8**	CC726	c.236A>G	p.(Gln79Arg)	chr12:g.112888220	3 (16)	rs121918466	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D

9	F10838-1	c.236A>G	p.(Gln79Arg)	chr12:g.112888220	3 (16)	rs121918466	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
10*	F11391-1	c.417G>C	p.(Glu139Asp)	chr12:g.112891083	4 (16)	rs397507520	painel	PS1 + PS3 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
11	CC5458	c.417G>C	p.(Glu139Asp)	chr12:g.112891083	4 (16)	rs397507520	exoma	PS1 + PS3 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
12	CC5407	c.417G>T	p.(Glu139Asp)	chr12:g.112891083	4 (16)	rs397507520	exoma	PS1 + PS3 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
13	F11621-1	c.854T>C	p.(Phe285Ser)	chr12:g.112915455	8 (16)	rs121918463	painel	PS1 + PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
14	F12101-1	c.922A>G	p.(Asn308Asp)	chr12:g.112915523	8 (16)	rs28933386	exoma	PS3 + PS4 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	0,00001	NA	D	D	D	D	D
15	CC2016	c.923A>G	p.(Asn308Ser)	chr12:g.112915524	8 (16)	rs121918455	exoma	PS1 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	B	D	D
16	F11962-1	c.923A>G	p.(Asn308Ser)	chr12:g.112915524	8 (16)	rs121918455	exoma	PS1 + PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	B	D	D
17*	CC5680	c.922A>G	p.(Asn308Asp)	chr12:g.112915523	8 (16)	rs28933386	painel	PS3 + PS4 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	0,00001	NA	D	D	D	D	D
18.1*	F11303-1	c.922A>G	p.(Asn308Asp)	chr12:g.112915523	8 (16)	rs28933386	Sanger exon 8	PS3 + PS4 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	0,00001	NA	D	D	D	D	D
19.1*	F10782-1	c.922A>G	p.(Asn308Asp)	chr12:g.112915523	8 (16)	rs28933386	painel	PS3 + PS4 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	0,00001	NA	D	D	D	D	D

20*	CC5657	c.922A>G	p.(Asn308 Asp)	chr12:g. 112915523	8 (16)	rs28933386	painel	PS3 + PS4 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	0,00001	NA	D	D	D	D	D
21	CC5530	c.923A>G	p.(Asn308 Ser)	chr12:g. 112915524	8 (16)	rs121918455	exoma	PS1 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	B	D	D
22	F11276-1	c.1391G>C	p.(Gly464 Ala)	chr12:g. 112926258	12 (16)	rs121918469	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
23	CC1158	c.1507G>A	p.(Gly503 Arg)	chr12:g. 112926887	13 (16)	rs397507545	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
24	CC3770	c.1510A>G	p.(Met504 Val)	chr12:g. 112926890	13 (16)	rs397507547	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	3E-06	NA	D	D	D	D	D
25	CC4388	c.1510A>G	p.(Met504 Val)	chr12:g. 112926890	13 (16)	rs397507547	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	3E-06	NA	D	D	D	D	D
26	F12047-1	c.1510A>G	p.(Met504 Val)	chr12:g. 112926890	13 (16)	rs397507547	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	3E-06	NA	D	D	D	D	D
27	CC5608	c.1510A>G	p.(Met504 Val)	chr12:g. 112926890	13 (16)	rs397507547	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	3E-06	NA	D	D	D	D	D
28	F11541-1	c.1510A>G	p.(Met504 Val)	chr12:g. 112926890	13 (16)	rs397507547	painel	PS3 + PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	3E-06	NA	D	D	D	D	D
***SOS1*:NM_005633.3**								*mesma troca (PS1) *funcional (PS3)								
29.1	F11869-1	c.806T>C	p.(Met269 Thr)	chr2:g.39278343	7 (24)	rs137852813	painel	PM1 + PM2 + PM5 + PM6 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D

30	CC5746	c.1655G>A	p.(Arg552 Lys)	chr2:g.39249914	11 (24)	rs397517154	exoma	PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	B	D	D
31.1*	F10785-1	c.2002C>A	p.(Gln668 Lys)	chr2:g.39241069	13 (24)	NA	painel	PM2 + BS4 + PP2	VUS	NA	NA	D	D	B	D	D
***RAF1*:NM_002880.3**																
32	F10286-1	c.781C>G	p.(Pro261 Ala)	chr3:g.12645688	7 (17)	rs121434594	painel	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
33	F10303-1	c.788T>G	p.(Val263 Gly)	chr3:g.12645681	7 (17)	rs397516830	exoma	PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
***RIT1*:NM_006912.5**																
34	F10577-1	c.242A>G	p.(Glu81Gly)	chr1:g.155874289	5 (6)	rs869025193	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
35	CC5661	c.246T>G	p.(Phe82Leu)	chr1:g.155874285	5 (6)	rs730881014	exoma	PS1 + PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
***NRAS*:NM_002524.5**																
36	F10167-1	c.34G>C	p.(Gly12Arg)	chr1:g.115258748	2 (7)	rs121913250	exoma	PM1 + PM2 + PM5 + PP1 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	B	NA	D
37.1*	CC5100	c.179G>A	p.(Gly60Glu)	chr1:g.115256532	3 (7)	rs267606920	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP1 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	0.00003	NA	D	D	D	NA	D
38	CC4602	c.149C>T	p.(Thr50Ile)	chr1:g.115256562	3 (7)	rs267606921	exoma	PS3 + PM2 + PP2 + PP5	PP	NA	NA	D	D	B	B	D

***KRAS*:NM_004985.4**																
39	F11444-1	c.101C>T	p.(Pro34Leu)	chr12:g.25398218	2 (5)	rs104894366	exoma	PS3 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
40	CC883	c.458A>T	p.(Asp153Val)	chr12:g.25362838	5 (5)	rs104894360	exoma	PS3 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	NA	D
***HRAS*:NM_005343.4**																
41	F10275-1	c.38G>A	p.(Gly13Asp)	chr11:g.534285	2 (6)	rs104894226	Sanger exon 2	PM1 + PM2 + PM5 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
42	F10280-1	c.34G>A	p.(Gly12Ser)	chr11:534289	2 (6)	rs104894229	Sanger exon 2	PM! + PM2 + PM5 + PP5	PP							
43	F10178-1	c.35G>C	p.(Gly12Ala)	chr11:g.534288	2 (6)	rs104894230	Sanger exon 2	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
44	F9713-1	c.34G>A	p.(Gly12Ser)	chr11:g.534289	2 (6)	rs104894229	painel	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
***BRAF*:NM_004333.5**																
45	CC2492	c.1390G>A	p.(Gly464Arg)	chr7:g.140481418	11 (18)	rs121913349	exoma	PS1 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
46	CC893	c.1502A>G	p.(Glu501Gly)	chr7:g.140477806	12 (18)	rs180177039	exoma	PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
47	F11874-1	c.1802A>T	p.(Lys601Ile)	chr7:140453133	15 (18)	rs397507484	exoma	PM1 + PM2 + PM5 + PP2	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
48	F11620-1	c.739T>C	p.(Phe247Leu)	chr7:g.140501333	6 (18)	rs397516903	painel	PS1 + PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D

49	F11108-1	c.1783T>C	p.(Phe595 Leu)	chr7:g.14045315 2	15 (18)	rs794729219	painel	PS1 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
50	CC5731	c.1455G>C	p.(Leu485 Phe)	chr7:g.14047785 3	12 (18)	rs180177036	painel	PS1 + PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
51	F9186-1	c.730A>C	p.(Thr244 Pro)	chr7:g.14050134 2	6 (18)	rs397507465	painel	PM1 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
***MAP2K1*:NM_002755.3**																
52	CC5059	c.389A>G	p.(Tyr130 Cys)	chr15:g.66729181		rs121908595	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	0.000003	NA	D	D	D	D	D
53	F11961-1	c.389A>G	p.(Tyr130 Cys)	chr15:g.66729181		rs121908595	exoma	PS3 + PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	0.000003	NA	D	D	D	D	D
***MAP2K2*:NM_030662.3**																
54	F10261-1	c.181A>G	p.(Lys61Glu)	chr19:g.4117539	3 (11)	rs730880517	painel	PM1 + PM2 + PM5 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
55	F11839-1	c.335G>T	p.(Arg112 Leu)	chr19:g.4110622	3 (11)	NA	exoma	PS3 + PM2 + PP3	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
***NF1*:NM_000267.3**																
56	CC5105	c.3721C>T	p.(Arg1241*)	chr17:g.29562641	28 (57)	rs137854562	exoma	PVS1 + PM1 + PM2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	NA	D	D
57	CC5088	c.3989_3992del	p.(Glu1330Alafs*12)	chr17:g.29576016	30 (57)	NA	exoma	PVS1 + PM2	PP	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
58.1*	F10159-1	c.4158T>G	p.(Ser138	chr17:g.2958540	31	NA	Sanger	PM1 + PM2 + PP1	PP	NA	NA	D	D	D	D	D

			6Arg)	9	(57)		exon 31	+ PP3								
59.1*	F12102-1	c.3118A>G	p.(Lys1040Glu)	chr17:g.29557864	24 (57)	rs1555614619	exoma	PM2 + PP3	VUS	NA	NA	D	D	D	D	D
***RASA1*:NM_002890.2**																
60	CC5072	c.2698_2701del	p.(Val900Phefs*10)	chr5:g.86679537	21 (25)	rs886041232	exoma	PVS1 + PM1 + PM2 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
***PPP1CB*:NM_002709.3**																
61	CC5217	c.146C>G	p.(Pro49Arg)	chr2:g.28999810	2 (8)	rs886037952	exoma	PS4 + PM2 + PP2 + PP3 + PP5	PP	NA	NA	D	D	D	D	D
***LZTR1*:NM_006767.4**																
62.1	F11522-1	c.398T>G	p.(Phe133Cys)	chr22:g.21341870	4 (21)	NA	painel	PM2 + PP3 + BS4	VUS	NA	NA	D	D	D	D	D
NOVOS GENES																
***ACTC1*:NM_005159.4**																
63.1	F10557-1	c.487C>T	p.(His163Tyr)	chr15:g.35084738	4 (7)	NA	exoma	PS3 + PM2 + PP2 + PP3	PP	NA	NA	D	D	NA	NA	D
OUTROS GENES ASSOCIADOS A DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS																

***ACTB*:NM_001101.5**																
64	CC5114	c.215A>G	p.(Glu72Gly)	chr7:g.5568940	3 (6)	rs1131691341	exoma	PM2 + PP2 + PP3 + PP4 + PP5	PP	NA	NA	D	D	NA	D	D
***KAT6A*:NM_006766.5**																
65	CC5305	c.3385C>T	p.(Arg1129*)	chr8:g.41792353	17 (17)	rs786200960	exoma	PS3 + PM2 + PP5	PP	NA	NA	D	NA	NA	B	D
***PACS1*:NM_018026.4**																
66	CC1471	c.607C>T	p.(Arg203Trp)	chr11:g.65978677	4 (24)	rs398123009	exoma	PS3 + PS4 + PM2 + PP3 + PP5	PATOGENICA	NA	NA	D	D	D	D	D
***DPH1*:NM_001383.4**																
67.1	F11994-1	c.374T>C/ c.710G>A	p.(Leu125Pro)/ p.(Gly237Asp)	chr17:g.1939344 / chr17:g.1943063	4 (13) / 7 (13)	rs200530055/NA	exoma	PM2 + PP1 / PM2 + PP3 + PP1	PP / PP			-	-	-	-	-
VARIAÇÃO DE NÚMERO DE CÓPIAS - CNV																
68.1	F10600-2	arr[GRCh37] 19p13.3(1000354_2164378)x1 dn					exoma + *array* genômico									

*casos considerados familiais; **consanguinidade entre os pais do probando, Muito Forte (PVS1); Forte (PS1–PS4) Moderada (PM1–PM6); Suporte (PP1–PP5).

Figura 6: - Análise pelo IGV de cobertura do éxon 8 do gene *PTPN11* pela plataforma ilumina em dois probandos, com ausência de cobertura no caso superior e baixa cobertura no inferior.

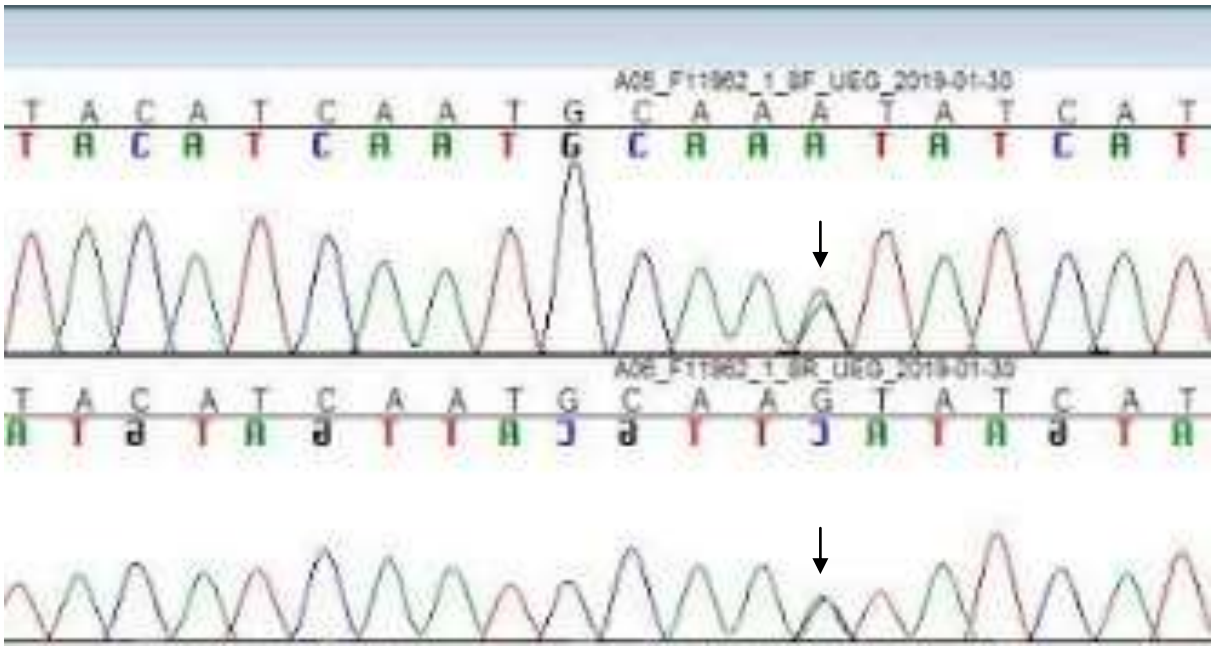

Figura 7: - Eletroferograma de parte do éxon 8 do gene *PTPN11*. A seta indica a troca A>G na posição c.922

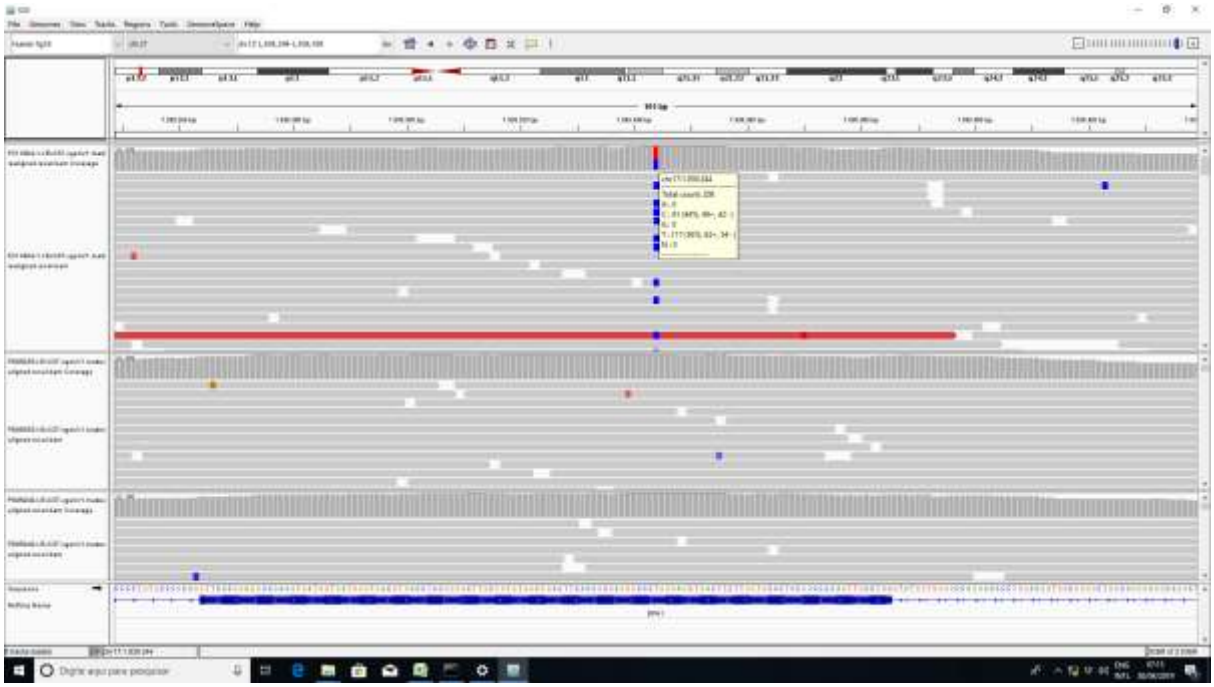

Figura 8: – Análise do IGV com a presença variante p.(Leu125Pro) no paciente F11994-1 no gene *DPH1* e dois controles negativos.

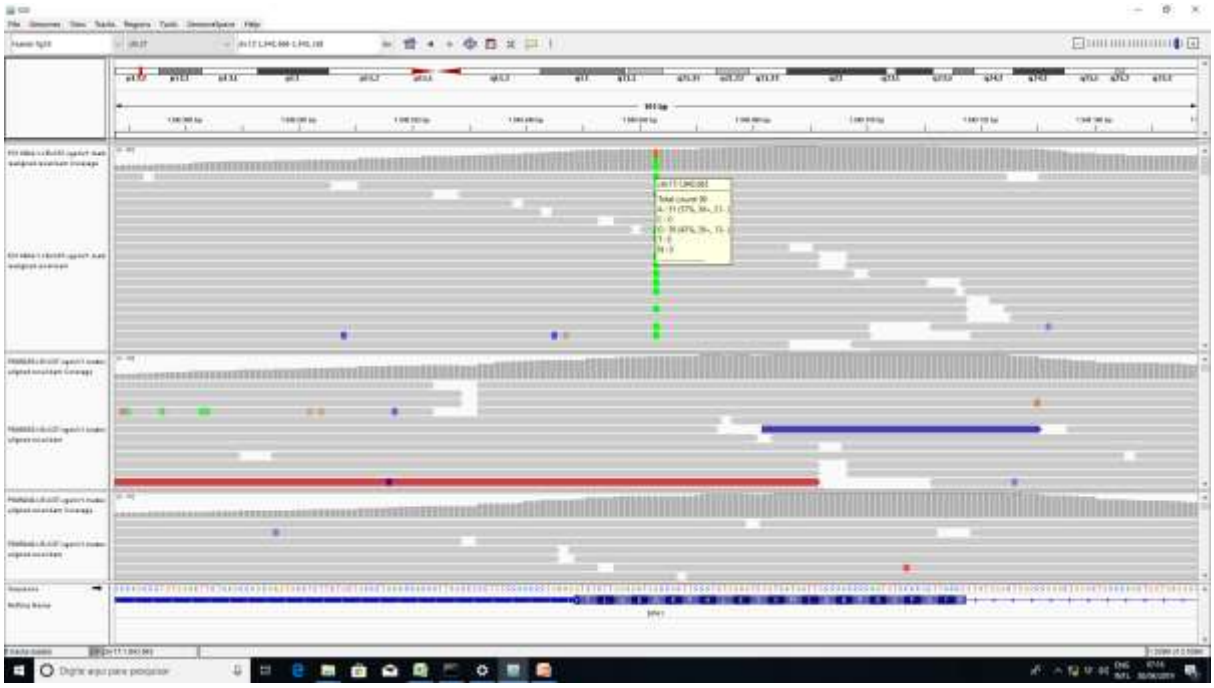

Figura 9: Análise IGV com a presença variante p.(Gly237Asp) no paciente F11994-1 no gene *DPH1* e dois controles negativos.

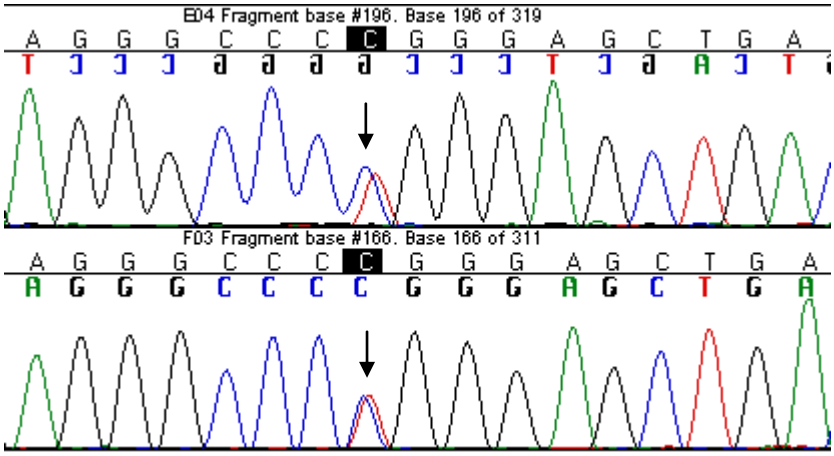

Figura 10: Eletroferograma do probando F11994-1 e genitora do gene *DPH1*. Na seta indica a presença da variante p.(Leu125Pro) respectivamente.

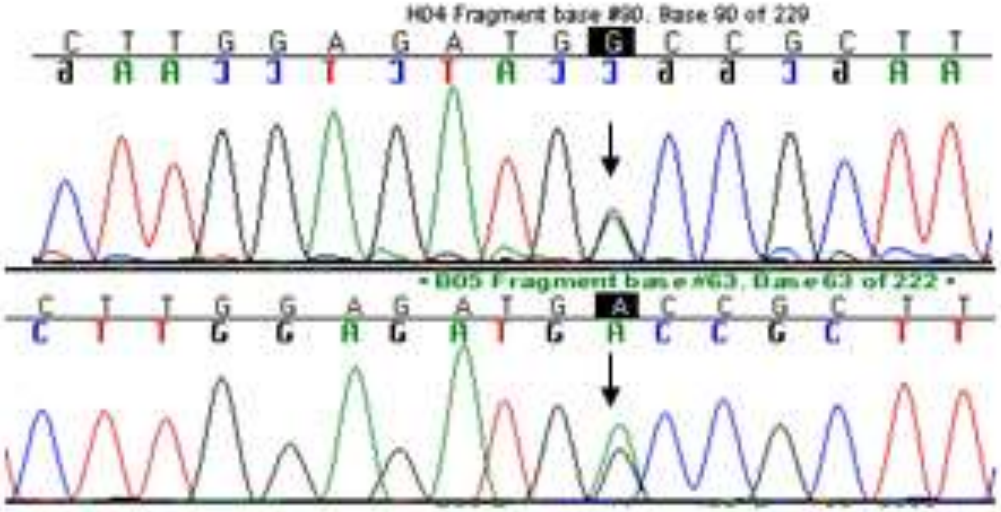

Figura 11: Eletroferograma do probando F11994-1 e genitor do gene *DPH1*. Na seta indica a presença da p.(Gly237Asp) respectivamente.

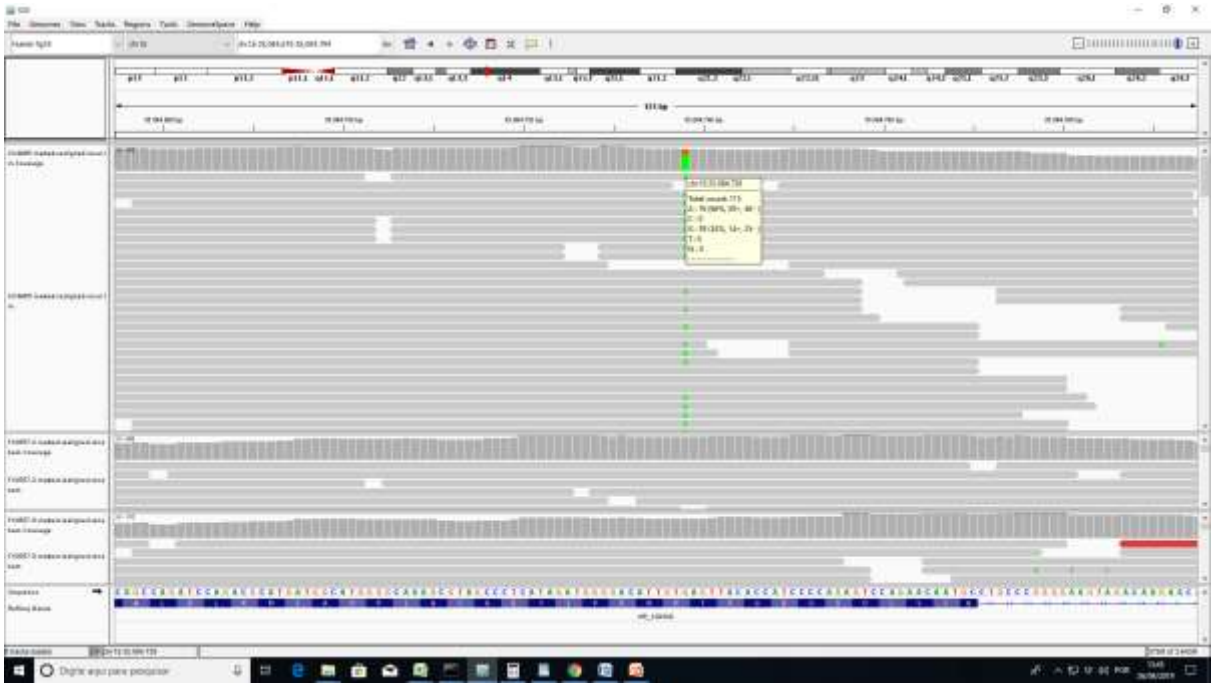

Figura 12: Variante em heterozigose no gene *ACTC1* no probando (CC4965) e ausente nos pais (F10557-2 e F10557-3).

Para a variante c.398T>G, identificada no éxon 4 do gene *LZTR1* e classificada como VUS, o seqüenciamento Sanger foi realizado para confirmação neste indivíduo e também em sua mãe, evidenciando que ambos apresentavam esta variante (figura 13 e 14).

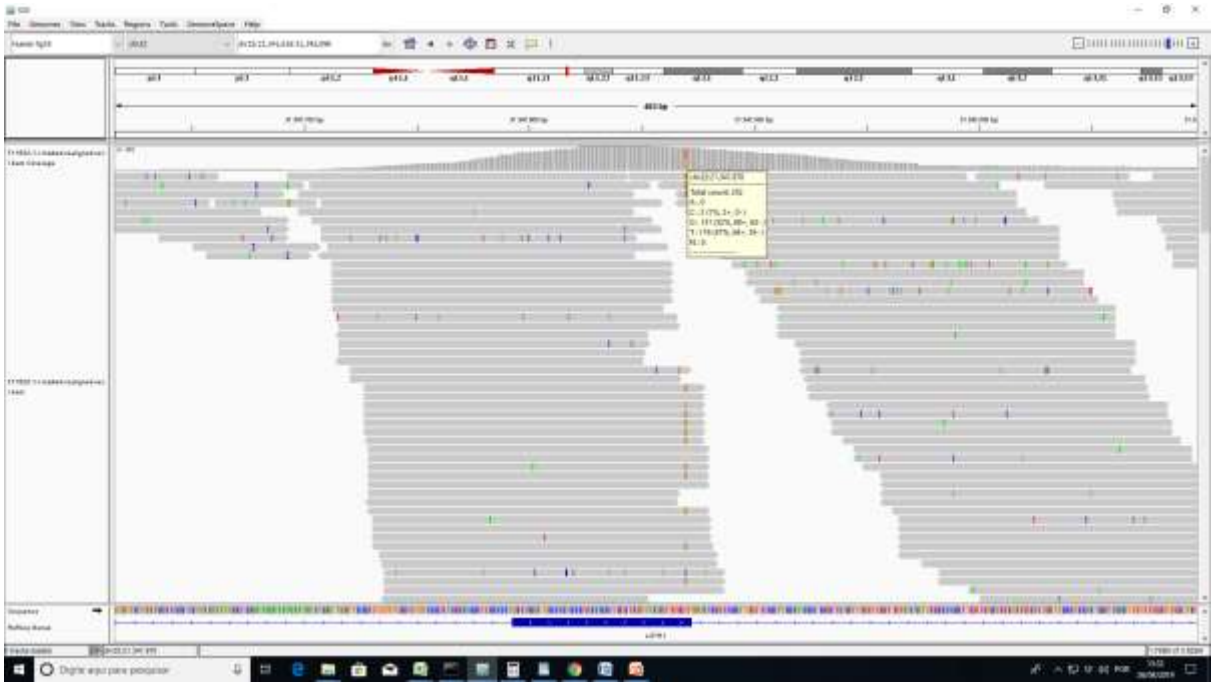

Figura 13: Variante em heterozigose no éxon 4 do gene *LZTR1* no probando (F11522-1).

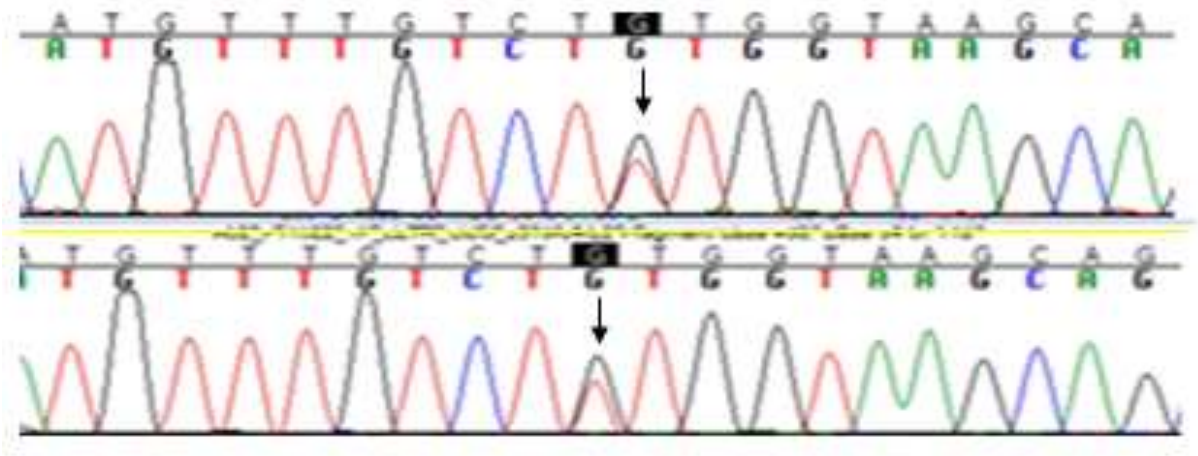

Figura 14: Eletroferograma de probando e genitora confirmando a presença da variante em heterozigose do gene *LZTR1* em ambos.

Os achados clínicos dos probandos com variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS estão descritas no anexo 1.

No caso dos genes clássicos associados a SN, uma análise da associação entre o genótipo e o fenótipo, incluindo pacientes prévios avaliados na Unidade de Genética do Instituto da Criança e com variantes nos genes *SOS1, RAF1 e RIT1*, mostrou uma diferença estatisticamente significante entre os grupos de genes e as seguintes características clínicas: a frequência da baixa estatura foi menor no grupo de pacientes com variantes no gene *SOS1* comparado com os grupos *PTPN11* e *RAF1*; a presença de estenose da valva pulmonar foi mais frequente no grupo *PTPN11* comparado com o grupo *RAF1* e a cardiomiopatia hipertrófica, mais frequente no grupo *RAF1* do que nos grupos *PTPN11, RIT1 e SOS1* (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação pelo teste exato de Fisher as características clínicas observadas no presente estudo e em pacientes previamente estudados no Instituto da Criança divididos por grupos de genes.

Características Clínicas	***PTPN11*** **Presente estudo N=28 N (%)**	***SOS1*** **Presente estudo N=2 Casuística prévia N=14 N total =16 N (%)**	***RAF1*** **Presente estudo N=2 Casuística prévia N= 8 N Total=10 N (%)**	***RIT1*** **N=2 Casuística prévia N=6 N total=8 N (%)**	***NRAS*** **N=3 N (%) N total=3 N (%)**	**Teste exato de Fisher P<0,05**
Baixa estatura	23 (82)	8 (50)	10 (100)	5 (62,5)	3 (100)	0,039 (*SOS1XPTPN11*) 0,0094 (*SOS1XRAF1*)
Dismorfismos faciais da SN	26 (93)	15 (94)	10 (100)	8 (100)	3 (100)	
Pescoço curto	23 (82)	15 (94)	10 (100)	7 (87,5)	3 (100)	
Cardiopatia congênita	21 (75)	15 (94)	10 (100)	8 (100)	2 (67)	
EPV/EPSV	15 (71)	13 (87)	1 (10)	4 (50)		0.0020 (*PTPN11XRAF1*)
Cardiomiopatia hipertrófica	2 (9,5)		9 (90)	2 (25)	1 (50)	0.000025 (*RAF1XPTPN11*) 0.0128 (*RAF1XRIT1*) 0,000004 (*RAF1XSOS1*)
Defeitos septais	3 (14)			2 (25)		
Defeito do septo AV	1 (5)	1 (6)				

Prolapso da valva mitral					1 (50)
Anomalia de Ebstein		1 (6)			
Deformidade esternal em S	4 (14)	4 (25)	3 (30)	1 (12,5)	0 (0)
Criptorquidia	9/17 (53)	5/11 (45)	2/5 (40)	2/5 (40)	0/1 (0)
Anomalias hematológicas	1/18 (5)	2/13 (15)	0/7 (0)	1/6 (17)	0/2 (0)
Deficiência do fator XI	1	1		1	
Hipoagregação plaquetária		1			
Tumores		TCG mandíbula/ maxila (2)	Processo expansivo cístico em fossa posterior	TCG mandíbula/ maxila (1)	
Outros achados	Perda auditiva e manchas café com leite (1)	Hiperqueratose folicular em face (3)		CC5661: óbito aos 9 meses Complexo de Dandy-Walker (1)	F10167-1 Hipoglicemia de difícil controle e colabamento da traquéia CC4602: características faciais de CFC e hidrocefalia

5. DISCUSSÃO

Na última década, um avanço tecnológico sem precedentes ocorreu na área da Genética com implicações nos atendimentos de pacientes afetados por diversas doenças genéticas, particularmente para aqueles que apresentam condições com um padrão monogênico de herança. O sequenciamento de nova geração, técnica já difundida no Brasil, é um exame de alta performance na obtenção de dados genômicos, o que tem possibilitado a descoberta, na última década, de genes responsáveis por diversas doenças, além de permitir a confirmação diagnóstica de uma doença monogênica, especialmente naquelas causadas por diversas variantes espalhadas ao longo do gene (heterogeneidade alélica) ou naquelas doenças com diversos genes envolvidos (heterogeneidade de loco).

5.1. NGS nas RASOPATIAS: Avaliação dos genes da via RAS/MAPK

Um dos objetivos deste estudo foi identificar variantes em genes já reconhecidamente associados às RASopatias. Na utilização da plataforma Illumina, o sequenciamento de nova geração mostrou uma cobertura das regiões de interesse, na grande maioria das vezes homogênea, permitindo a identificação de variantes patogênicas e provavelmente patogênicas em genes da via RAS/MAPK em 57% dos probandos da casuística avaliados neste estudo. Esta positividade é intermediária entre os dados obtidos por Lepri et al. (2014) de 47,5% e Bhoj et al. (2016) de 19% e os de Čizmárová et al. (2016) de 69% e Koh et al., 2019 de 76% (Tabela 9). A ampla diferença observada na positividade entre os diferentes estudos pode ser explicada em parte pelos critérios de inclusão e pelas referências médicas. No trabalho de Bhoj et al. (2016), com a menor positividade, vários pacientes foram encaminhados por médicos não especialistas e no trabalho de Koh et al. (2019), a casuística estudada foi pequena, de 17 indivíduos, os quais preenchiam os critérios clínicos de van der Burgt et al., 1994. Além disso, no trabalho de Čizmárová et al. (2016) os resultados foram analisados pelo número total da casuística (51) e não pelo número de probandos (45). Outro fato que merece destaque é a menor

positividade obtida em nossa casuística nos principais genes associados à SN, particularmente os genes *PTPN11 e SOS1*, com maior destaque para genes pouco expressivos na SN, como o *NRAS* (Tabela 8). Variantes no gene *PTPN11* são as mais frequentes na SN, ocorrendo em aproximadamente 50% dos casos, seguida de variantes nos genes *SOS1* (10%), *RAF1* (10%) e *RIT1* (5%) (Tartaglia et al., 2012; Aoki et al., 2013). O fato de parte da casuística do presente estudo ser composta de pacientes que já haviam sido avaliados para os hotspots dos principais genes pelo sequenciamento de Sanger pode explicar essa diferença.

Tabela 9: Positividade do NGS e genes envolvidos em indivíduos avaliados por RASopatia no presente estudo e em estudo prévios da literatura

Variantes em genes da via RAS/MAPK	Presente Trabalho n=104	Lepri et al. (2014) n=80 painel	Bhoj et al. (2016) n=126 painel	Čizmárová et al. (2016) n=45 n=51 de 45 famílias (Sanger + NGS)	Koh et al., 2019 n=17
Casos positivos N (%)	59 (57)	38 (47,5)	24 (19)	35/51 (69)	13 (76)
Genes N (%)					
PTPN11	28 (47)	22 (58)	17 (71)	22 (63)	8 (61,5)
SOS1	2 (3,3)	9 (23)	3 (13)	2 (6)	3 (23)
RAF1	2 (3,3)	2 (5)	2 (8)		
RIT1	2 (3,3)			1 (2,86)	1 (7,7)
NRAS	3 (5)				
KRAS	2 (3,3)				1 (7,7)
BRAF	7 (12)	2 (5)		3 (8,57)	
MAP2K1	2 (3,3)		1 (4)	2 (5,71)	
MAP2K2	2 (3,3)	2 (5)	1 (4)		

SHOC2			1 (2,86)
PPP1CB	1 (1,6)		
HRAS	4 (7)		2 (8,57)
NF1	3 (7)		2 (5,71)
RASA1	1 (1,6)		
CBL		1 (3)	

A grande maioria das variantes encontradas na nossa casuística nos genes da via RAS/MAPK foi do tipo missense, compatível com o que é descrito na literatura. O mecanismo proposto para expressão do fenótipo nas RASopatias é de ganho de função das variantes, na maioria dos casos, o que acarreta em um aumento da sinalização da via RAS/MAPK (Gelb & Tartaglia, 2006). Como exceção, têm-se as variantes de perda de função no gene NF1, o qual normalmente exerce um efeito negativo sobre a via de sinalização Desta forma, essas variantes de perda de função em NF1 levam também ao aumento da sinalização da via RAS/MAPK (Koczkowska et al., 2018).

A grande maioria das variantes encontradas nesta casuística já foram reportadas anteriormente, algumas recorrentes, como as variantes nos resíduos p.Asn308 e p.Met504, no gene *PTPN11*, e p.Met269 e p.Arg552 no gene *SOS1* (Tartaglia et al., 2011). Em concordância com os dados da literatura, as variantes mais comuns neste estudo foi a p.Asn308, seguida da p.Met504 no gene *PTPN11*. Variantes não reportadas previamente foram encontradas nos genes *MAP2K2*: c.335G>T e no gene *NF1*: c.3989_3992del e c.4158T>G. Para a variante em *MAP2K2*, para obter mais certeza da sua patogenicidade, o sequenciamento por Sanger da região foi realizado nos genitores e mostrou que nenhum deles apresentava a variante, sendo portanto um evento de novo. No caso da variante missense em *NF1,* o estudo dos parentes de 1º grau mostrou que ela segregava com o fenótipo na família, o que permitiu classificá-la como provavelmente patogênica.

Dos genes mais recentemente descritos associados às RASopatias, destacam-se os genes *RIT1*, pela sua frequência, sendo hoje considerado um dos quatro genes mais importantes na SN, juntamente com os genes *PTPN11, SOS1* e

RAF1, e o gene *LZTR1*. Variantes em *LZTR1* podem levar à SN estando presente em apenas uma cópia do gene, particularmente quando localizadas nos domínios KT1-4 da proteína, com um mecanismo de ação proposto como dominante negativo, ou com variantes nas duas cópias do gene (bialélicas), por perda de função (Yamamtoto et al., 2015; Johnston et al., 2018; Pagnamenta et al., 2019). Diferente do gene *RIT1*, o gene *LZTR1* parece ser responsável por uma fração muito pequena dos casos da SN como um todo, mas adquire maior importância naqueles indivíduos previamente triados para os genes mais comuns (Pagnamenta et al., 2019). No presente estudo, duas variantes missense em *RIT1* e uma única variante no gene *LZTR1*:p.Phe133Cys foram encontradas. Esta última estava presente em um lactente com características faciais típicas da SN e cardiomiopatia hipertrófica grave, evoluindo para óbito precoce pelo problema cardíaco. Por ter sido classificda como VUS, foi realizado o sequenciamento na sua genitora, mostrando que a variante em *LZTR1* havia sido herdada de sua mãe, a qual não apresenta características clínicas da SN. Desta forma, esta variante permaneceu classificada como VUS, sendo pouco provável de ser a responsável pelo fenótipo desta criança. Outra variante classificada como VUS, o SNV em *SOS1*:p.Gln668Lys também foi considerado como não responsável pelo fenótipo no probando, uma vez que a genitora, considerada como afetada pela SN, não apresentava a variante. Já a variante missense encontrada em *NF1*: p.Lys1040Glu não pode ser descartada. Há milhares de variantes descritas no gene *NF1*, muitas de perda de função, além de microdeleções que incluem o gene *NF1* (Koczkowska et al., 2018). Recentemente, uma variante missense no resíduo p.Arg1038 no éxon 23 do gene *NF1* foi descrita em duas famílias com um quadro clínico leve da neurofibromatose tipo I (apenas manchas café com leite) e características faciais da SN (Trevisson et al., 2019). A família aqui estudada apresenta uma variante missense em um resíduo próximo, o p.Lys1040 no éxon 24 e também tem um fenótipo leve. A avaliação clínica e o estudo molecular de outros indivíduos desta família podem auxiliar no estabelecimento da patogenicidade desta variante e assim contribuir para a possibilidade de que variantes missense nas regiões exônicas 23 e 24 de *NF1* levam a um quadro mais leve e com menos complicações clínicas, como proposto por Trevisson et al., 2019.

Os pacientes com SN classificados como típicos clinicamente apresentaram variantes nos genes *PTPN11, SOS1, RAF1, RIT1, NRAS*.

A comparação entre os achados clínicos dentre os pacientes dos diferentes grupos, combinados com pacientes em seguimento na Unidade de Genética do Instituto da Criança previamente diagnosticados, mostrou uma diferença estatisticamente significante nas seguintes características clínicas, consideradas sinais cardinais nas RASopatias e que requerem seguimento especializado: a) a baixa estatura foi menos frequente em pacientes com variantes em *SOS1* quando comparados com aqueles com variantes em *PTPN11* e *RAF1;* b) a estenose pulmonar é mais frequente em indivíduos com variantes em PTPN11 que no gene *RAF1* e a cardiomiopatia hipertrófica, mais frequente em indivíduos com *RAF1* do que aqueles com variantes em *PTPN11, SOS1* e *RIT1* (Tabela 8). Estes achados estão de acordo com os observados na literatura, associando variantes em *RAF1* a uma alta frequência de cardiomiopatia e variantes em *PTPN11* e *SOS1* à estenose da valva pulmonar, assimi como variantes em *SOS1* a uma menor frequênica de baixa estatura (Tartaglia et al., 2011).

Para o gene *NRAS*, a casuística é muito pequena (3 probandos, sendo um caso familial) para realizar comparações estatísticas com os outros grupos. Destaca-se que esses indivíduos foram associados a um estudo colaborativo coordenado pelo pesquisador alemão (Dr. Martin Zenker) com o intuito de avaliar as características clínicas e os genótipos de indivíduos com variantes em um gene responsável por uma fração muito pequena na SN. No total foram avaliados 19 indivíduos de 13 famílias. Os códons p.Thr50 e p.Gly60 já haviam sido descritos em pacientes anteriores, caracterizando hotspots mutacionais. Já, variantes no resíduo p.Gly12 em *NRAS* e outros genes RAS são reconhedidamente locais de mutação somática em câncer. Quatro diferentes variantes germinativas neste resíduo foram descritas neste estudo colaborativo, incluindo o caso da paciente F10167-1 (p.Gly12Arg) aqui descrita. Esta paciente apresentava características clínicas no período neonatal que se assemelhavam à SC, como hipoglicemia de difícil controle, grave dificuldade respiratória e alimentar, requerendo traquestomia e gastrostomia. Além disso, foi ideitificada uma lesão tumoral no sistema nervoso central sugestiva de um hamartoma hipotalâmico (Tabela 8 e anexo 1). O fato da variante presente neste indivíduo estar em um resíduo comumente alterado em câncer, mais uma vez à semelhança do que se observa na SC, um seguimento com atenção especial a desenvolvimento de tumores deve ser realizado (Altmüller et al., 2017).

Nas SRSN avaliadas na casuística do presente estudo, indivíduos com diagnóstico clínco inicial da síndrome CFC apresentaram variantes nos genes *BRAF, MAP2K1, MAP2K2 e KRAS*; indivíduos com a síndrome de Costello, variantes em HRAS e variantes com neurofibromatose tipo I em *NF1.*

Em vários pacientes a distinção entre as RASopatias clássicas não se dá de forma tão precisa, particularmente a depender da idade da avaliação da criança. Alguns indivíduos com variantes em *KRAS, BRAF, MAP2K1* e *MAP2K2* tiveram seu diagnóstico alterado após o estudo molecular.

Assim, em um paciente com hipótese diagnóstica de SN foi encontrada a variante no gene *PTPN11*:c.1391G>C (p.Gly464Ala), associada na literatura a indivíduos com SNML. Esta criança foi avaliada inicialmente aos quatro anos de idade e, na evolução, diagnosticada com surdez. Normalmente as manchas lentiginosas, típicas desta síndrome, só aparecem após os cinco anos de idade. Desta forma, o teste molecular permitiu estabelecer um diagnóstico preciso antes do aparecimento do sinal cardinal da síndrome. Crianças com SNML apresentam com mais frequência déficit de audição e cardiomiopatia hipertrófica. O diagnóstico precoce destes achados permite um manejo clínico mais adequado dos indivíduos, evitando complicações que possam decorrer destas anomalias (Tartaglia et al., 2011).

Os pacientes com diagnóstico da síndrome CFC, diferentemente dos pacientes com SN, tendem a apresentar um atraso mais acentuado do desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual, com epilepsia, às vezes de difícil controle, hidrocefalia, nistagmo e maior envolvimento ecotdérmico. Nos pacientes com síndrome de Costello, o envolvimento cognitivo também tende a ser mais importante e são os que apresentam um maior risco para o desenvolvimento de tumores, tanto benignos, com destaque para os papilomas periorificiais, como malignos. Em ambas, há uma dificuldade alimentar nos primeiros meses de vida que muitas vezes requer o uso de sonda e/ou gastrostomia (Tartaglia et al., 2011). Esses achados foram constantes na casuística do presente estudo, tanto para os pacientes com diangóstico de CFC, como no diagnóstico da SN.

Dentre os pacientes com a SC, a paciente F10275-1 apresentava uma variante rara em *HRAS*, acometendo o resíduo p.Gly13. A grande maioria dos inidivíduos diagnosticados com a SC (>80%) apresentam a variante p.Gly12Ser e o fenótipo tende a ser mais homogêneo nesta síndrome. No entanto, a paciente

F10275-1 apresentava características clínicas menos acentuadas e foi inicialmente avaliada como um possível caso de SNLLAH. O estudo conjunto das características clínicas desta paciente com outros quatro em seguimento pela Dra. Karen Gripp duPont Hospital for Children/Nemours, Delaware, Estados Unidos, mostrou que indivíduos com variantes no resíduo p.Gly13 no gene HRAS apresentam um fenótipo com características faciais menos grosseiras, e cabelos esparsos, com crescimento lento, semelhante ao encontrado na SNLLAH (Bertola et al., 2017).

Um único probando na nossa casuística apresentava uma variante missense no gene *PPP1CB* (p.Pro49Arg), um gene descrito em 2016 associado a um fenótipo semelhante ao observado em pacientes com SNLLAH. A variante encontrada corrobora a importância tanto do resíduo acometido, que se mostrou recorrente em cinco pacientes, como do fenótipo, compatível com uma síndrome Noonan-like com envolvimento ectodérmico – cabelos finos, esparsos e de crescimento lento (Gripp et al., 2016). O fato do paciente aqui estudado apresentar craniossinostose, um achado clínico não descrito nos outros pacientes, permitiu ampliar o fenótipo desta nova RASopatia, uma vez que a craniossinostose é mais prevalente nos pacientes com variantes no gene *KRAS* (Bertola et al., 2017).

Em um indivíduo com anomalias vasculares e características faciais da SN (CC5072), um caso isolado na família, foi encontrada uma variante de perda de função no gene *RASA1*. Nenhuma outra variante em genes já associados às RASopatias foi identificada. Variantes em heterozigose de perda de função neste gene estão associadas à síndrome de malformação capilar e malformação arteriovenosa (OMIM 608354). Este gene é integrante da família GAP1 das GTPases, exercendo um papel na regulação, diferenciação e proliferação celular, particularmente na angiogênese. A variante encontrada no paciente no presente estudo foi recentemente descrita em um menino de 7 anos com diagnóstico da Parkes-Weber por apresentar múltiplas malformações capilares e fístula arteriovenosa na perna (Wooderchak-Donahue et al., 2018).

Embora características clínicas da SN não tenham sido descritas nos pacientes com síndrome de malformação capilar e malformação arteriovenosa, Chen et al. (2014) descreveram três pacientes com fenótipo Noonan apresentando variantes missense de perda de função em *RASA2*, outra proteína GTPase, nos quais os autores sugeriram ser uma causa provável do fenótipo Noonan.

Até o momento, pode-se apenas especular um papel mais amplo, não restrito apenas ao fenótipo vascular, em *RASA1*. Ainda persiste a possiblidade do indivíduo CC5072 aprensentar uma variante em outro gene ainda não associado às RASopatias que possa explicar seu quadro clínico, em conjunto à variante em *RASA1.*

5.2. NGS e possível novo gene associados às RASOPATIAS

5.2.1. ACTC1

Em um caso isolado, de pais não-consanguíneos, com hipótese diagnóstica da síndrome de Noonan, o exoma realizado no probando não evidenciou nenhuma variante rara em genes já conhecidos associados às RASopatias. Foi então realizado o exoma do trio, para avaliação de variantes novas (presentes apenas no probando) ou bilalélicas. Na análise, uma variante de novo foi encontrada no gene *ACTC1*:NM_005159:exon4:c.C487T:p.H163Y, classificda pelos critérios da ACMG como provavelmente patogênica.

ACTC1 é uma actina alfa, um dos componentes do sarcômero, o principal componente de filamentos finos nos miócitos cardíacos maduros, com papel importante na contratilidade da musculatura cardíaca. Variantes em heterozigose neste gene já foram associadas, como uma causa rara, às diversas formas de cardiomiopatia (dilatada, hipertrófica, restritiva, não-compactação do ventrículo esquerdo), assim como a anomalias estruturais, como comunicação interatrial (CIA) e anomalia de Ebstein (Yang et al., 2019).

Em 2015, Augière et al. descreveram uma família libanesa com 13 indivíduos apresentando anomalias cardíacas (defeitos septais, particularmente atrial, isolado ou associado a outras anomalias cardíacas, incluindo um indivíduo com anomalia de Ebstein; arritmias cardíacas, como a síndrome de Wolff-Parkinson-White, bradicardia sinusal e fibrilação atrial e cardiomiopatia, hipertrófica e dilatada) e defeitos de linha media (hipertelorismo ocular, deformidade esternal, cifoescoliose, lábio leropino e diastema dos incisivos superiores. Na tentativa de identificar uma causa monogênica para as alterações presentes nesta família, os autores realizaram uma análise de ligação, com om lod score de 2.98 para uma região do cromossomo 15. O intervalo

cromossômico de interesse continha 37 genes e entre eles, o *ACTC1* era o melhor gene candidato. O sequenciamento tradicional por Sanger dos seis éxons codificantes deste gene mostrou a presença da variante c.251T>C (p.Met84Thr) segregando com o fenótipo nesta família, tanto da parte cardíaca, como das anomalias de linha média. Desta forma, os autores sugeriram que esta variante em *ACTC1* seria responsável por todos os achados clínicos nesta família.

As variantes descritas na literatura associadas a anomalias estruturais, particularmente CIA, incluem, além da descrita nesta família libanesa, as seguintes variantes: p.E101K, M125V e M178L (Augière et al., 2015; Yang et al., 2019). Augière et al (2015) comentaram que uma possível correlação genótipo-fenótipo pode ser observada pelo fato de que todas as variantes descritas até então associadas a defeitos cardíacos estruturais se encontram na metade N-terminal da proteína, entre os resíduos 84 e 178. Na região C-terminal da proteína, as variantes estão associadas particularmente à cardiomiopatia hipertrófica e não-compactação do ventrículo esquerdo.

O paciente aqui descrito apresenta uma variante nova, ainda não reportada, no resíduo p.His163, incluído no intervalo no qual foram descritos os defeitos cardíacos estruturais. Além disso, este indivíduo também apresenta anomalias de linha média com um fenótipo clinico compatível com a síndrome de Noonan. Embora não existam fotografias dos indivíduos da família libanesa, há descrição de hipertelorismo ocular e deformidades esternais, características comuns nesta síndrome. Embora não seja possível excluir que a variante presente em no indivíduo do presente estudo seja responsável apenas pelo fenótipo cardíaco e outra variante, ainda não identificada leve ao fenótipo de Noonan, o fato de ser o segundo caso com anomalias extra-cardíacas, reforça a possibilidade de que *ACTC1* desempenhe um função extra-cardíaca no desenvolvimento embrionário e variantes neste gene possa ser uma causa pouco frequente na síndrome de Noonan. Estudos funcionais mostraram que a actina cardíaca, embora seja a isoforma alfa mais abundante no cardiomiócito adulto, no feto ela é a principal isoforma no músculo esquelético, confirmando uma expressão muscular mais global (Ilkovski et al., 2005). A actina cardíaca apresenta uma grande homologia com ACTG1 e ACTB, os quais são expressos de forma ubíqua, e variantes em heterozigose nestes genes foram associados à síndrome de Baraitser-Winter, a qual apresenta uma sobreposição clínica evidente com a SN (Verloes et al., 2015).

Este achado é preliminar e novos relatos de indivíduos com fenótipo Noonan e variantes em *ACTC1* são necessários para estabelecer uma relação causal.

5.3. NGS e variantes patogênicas em genes associadas a outras doenças monogênicas

Em quatro pacientes da casuística nos quais o sequenciamento do exoma foi realizado, variantes em genes associados a outras doenças monogênicas foram encontradas, três delas em heterozigose nos genes *ACTB, PACS1* e *KAT6A* e uma em heterozgose composta no gene *DPH1*, consideradas como responsáeis pelos fenótipos. Ainda, em um quinto paciente, o estudo combinado do exoma e do array genômico permitiu identificar uma deleção no cromossomo 19, entre as posições genômicas 1000354 e 2164378, presente apenas no probando, caracterizando um evento de novo.

Diversos genes, incluindo o *PACS1, KAT6A e DPH1*, foram associados a quadros de deficiência intelectual não-sindrômica ou sindrômica a partir do emprego do sequenciamento de nova geração e, a partir daí, os fenótipos começaram a ser delineados com maior precisão. Muitas vezes as características clínicas são inespecíficas, o que não permite um reconhecimento por parte dos geneticistas clínicos.

5.3.1. PACS1

A variante no gene *PACS1* encontrada no indivíduo CC1471 é recorrente e associada à síndrome de Schuurs-Hoeijmakers (OMIM 615009), descrita em 2012 a partir de um estudo de dois pacientes dentre mais de 5000 indivíduos com deficiência intelectual (Schuurs-Hoeijmakerset al., 2012). Pela similaridade das características clínicas entre esses dois indivíduos, foi realizado o sequenciamento do exoma nestes pacientes e observado que ambos apresentavam a mesma variante em heterozigose (c.607C>T) no gene *PACS1*, a qual era de novo nos dois casos. O produto deste gene atua na regulação do tráfego intracelular de proteínas. Estudos em modelos animais sugerem que a variante presente nos indivíduos exerça um efeito dominante negativo (Schuurs-Hoeijmakers et al., 2012). Em 2016,

o mesmo grupo descreveu as características clínicas de 19 indivíduos apresentando a mesma variante em *PACS1*, caracterizando uma nova síndrome associada à deficiência intelectual com um padrão de herança autossômico dominante e com uma variante recorrente. As características clínicas incluem, além da deficiência intelectual, epilepsia, dismorfismos faciais (sobrancelhas hirsutas e arqueadas, ptose palpebral, hipertelorismo ocular com inclinação ínfero-lateral das fendas palpebrais, cílios longos, nariz com ponta bulbosa, filtro apagado, macrostomia, com lábio superior fino e rima voltada para baixo, diastema dos dentes incisivos, orelhas simplificadas e baixo-implantadas), anomalias cardíacas, particularmente os defeitos septais, oftalmológicas, sendo frequente os colobomas, cerebrais, geniturinárias (Schuurs-Hoeijmakers et al., 2018). Além da variante recorrente c607C>T em *PACS1*, uma outra mutação envolvendo o mesmo resíduo (c.608G>A, p.Arg203Gln) foi descrita (Miyake et al., 2018). O paciente do presente estudo, com a variante recorrente no gene PACS1, apresentava, entre vários achados clínicos, a presença de coloboma do nervo óptico. Várias das características descritas nesta nova síndrome se sobrepõem às observadas nas RASopatias, devendo ser aventada entre seus diagnósticos diferenciais.

5.3.2. KAT6A

No paciente aqui descrito com hipótese clínica de CFC (CC5305) foi identificada a variante nonsense em heterozigose em *KAT6A*: c.C3385T:p.R1129*.

O gene *KAT6A* pertence à família MYST acetiltransferasesde histona, exercendo um papel importante em várias funções celulares, como remodelamento da cromatina, regulação gênica, tradução protéica, metabolismo e replicação celular.

O estudo de uma casuística com 75 pacientes, sendo 52 deles casos não descritos previamente, permitiu a caracterização clínica desta síndrome denominada retardo mental autossômico dominante 32 no OMIM (616268). Além do atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual de grau variável, achados cardinais, outros achados incluem problemas gastrintestinais (refluxo gastro-esofágico, obstipação intestinal, má rotação intestinal), anomalias cardíacas, particularmente defeitos septais, dismorfismos craniofaciais (estreitamento bitemporal, presença de epicanto, estrabismo, ponte nasal alta e ponta alargada,

filtro curto e apagado, lábio superior fino, com boca triangular, palato alto e estreito, anomalias dentárias, orelhas baixo-implantadas e/ou rodadas, com dobramento exacerbado da hélice). Neutropenia congênita foi descrita em alguns pacientes, com infecções de repetição (Kennedy et al., 2018).

Vale ressaltar que além do quadro do atraso do desenvolvimento neuropscimotor, microcefalia, dismorfismos faciais e cardiopatia no paciente aqui estudado, ele também apresenta hipoplasia das patelas. Variantes em heterozigose no gene parálogo, *KAT6B*, estão associados à síndrome genitopatelar, no qual a hipoplasia ou agenesia da patela é uma das características cardinais da síndrome. O fato de não ter sido descrito na literatura, pode-se especular que este achado, por ser uma anomalia de menor importância frente ao quadro de neurodesenvolvimento, pode não ter sido explorado pelos clínicos que acompanham essas crianças.

Diversas variantes, particularmente de perda de função (nonsense e frameshift) foram encontradas espalhadas nos vários domínios da proteína, mas com uma concentração nos penúltimos éxons do gene, particularmente envolvendo os resíduos 1019, 1024 e 1029. A variante nonsense encontrada no paciente aqui descrito é a mais prevalente na literatura, descrita em outros oito indivíduos. A análise dos achados clínicos e genômicos nesta última casuística permitiu observar um quadro clínico mais grave, com atraso mais acentuado do desenvolvimento neuropsicomotor e maior frequência de microcefalia, hipotonia, anomalias cardíacas e gastrintestinais, associadas a variantes de perda de função nos dois últimos éxons do gene *KAT6A,* quando comparada com variantes nos primeiros 15 éxons do gene. Estes achados sugerem que a presença das variantes nos últimos éxons implica na formação de uma proteína anormal que não sofrerá o decaimento do RNA e que, por um mecanismo de ganho de função ou por em efeito dominante-negativo, exercerá um efeito com maiores implicações do que o mecanismo da haploinsuficiência no caso de mutações de perda de função em regiões mais centroméricas do gene (Kennedy et al., 2018).

5.3.3. ACTB

A variante missense em heterozigose (c.A215G:p.Glu72Gly) presente no paciente aqui descrito (CC5114) foi classificada como VUS, tendo sido reportada

como provavelmente patogênica no ClinVar. Infelizmente DNA dos pais não estava disponível para estudos adicionais.

Variantes missense em heterozigose em *ACTB,* assim como em *ACTG1*, estão associadas à síndrome de Baratiser-Winter (OMIM 243310). Dentre os achados clínicos na síndrome, a baixa estatura, os dismorfismos faciais, o pescoço alado, a deformidade esternal, assim como defeitos cardíacos, mais comumente os septais, fazem com que esta síndrome apresente diversas semelhanças com a SN (Verloes et al., 2015).

5.3.4. DPH1

Duas variantes missense (c.374T>C e c.710G>A), cada uma em uma cópia do gene, foram encontradas no gene *DPH1* no inidvíduo (F11994-1). O sequenciamento por Sanger realizado no material da criança e de seus pais confirmou as duas variantes na criança e apenas uma delas em cada genitor (a variante c.374T>C herdada de sua mãe e a variante c.710G>A herdada de seu pai). Ela apresentava os seguntes achados clínicos: atraso acentuado do desenvolvimento neuropsicomotor associado ao complexo de Dandy-Walker, baixa estatura, dismorfismos craniofaciais, defeito septal e envolvimento ectodérmico (cabelos, sobrancelhas e cílios esparsos ou ausentes e unhas hiperconvexas). A anomalia do sistema nervoso central não é um achado comum nas RASopatias. Esta anomalia foi descrita apenas em um paciente com o diagnóstico de uma síndrome Noonan-like associada a variantes no gene *PPP1CB* (Grippet al., 2016). Pelo fato desta síndrome Noonan-like também apresentar envolvimento ectodérmico, este gene foi considerado inicialmente o melhor candidato para o seu fenótipo, mas nenhuma variante rara foi encontrada no indivíduo aqui estudado. A análise posterior identificou as variantes em *DPH1.*

O gene *DPH1* codifica uma enzima que é importante para a síntese da diphthamide, a qual catalisa a transferência do ADP-ribose do dinucleotídeo nicotinamida adenina para a diphtamide, inibindo a síntese protéica e levando à morte celular. Este gene também é considerado um supressor tumoral, o qual atua na regulação da proliferação celular, desenvolvimento embrionário e tumorogênese. A associação deste gene com uma doença de neurodesenvolvimento ocorreu

recentemente, em 2015, a partir do estudo de famílias com consanguinidade, recebendo a denominação de atraso do desenvolvimento com baixa estatura, dismorfismos faciais e cabelos esparsos (OMIM 616901) (Alazamiet al., 2015). Desde então, poucos casos (17 indivíduos de 7 famílias) foram descritos na literatura, a maioria deles filhos de pais consanguíneos ou provenientes de regiões isoladas. Os achados clínicos dos últimos dois probandos descritos, associados aos previamente reportados incluem em todos eles a presença de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor/ deficiência intelectual, dismorfismos craniofaciais, com anomalia da conformação craniana, cabelos, cílios e sobrancelhas esparsas, anomalias em mãos e pés. Outros achados comuns, com uma frequência igual ou maior que 70% são: anomalias do sistema nervoso central (agenesia do corpo caloso, complexo de Dandy-Walker e dilatação ventricular), epilepsia, anomalias dentárias e de unhas. Anomalias cardíacas foram descritas em 7/15 (47%), incluindo defeitos septais, tetralogia de Fallot e cardiomiopatia dilatada (Urreizti et al., 2019).

As variantes descritas incluem aquelas com perda de função, do tipo frameshift (2) e missense (6). A paciente aqui descrita tem duas variantes missense, sendo uma delas, a variante c.374T>C, recentemente descrita em homozigose em dois irmãos com um quadro grave de atraso do desenvolvimento e morte precoce em um deles, provenientes da Ilha de Malta (Urreizti et al., 2019). Estudos in vitro de variantes missense, incluindo a variante p.c374T>C, mostraram uma diminuição da atividade enzimática da diphtamide (Urreizti et al., 2019).

Os estudos realizados no indivíduo (F11994-1) e seus genitores permitiu comprovar que as variantes na criança estavam em heterozigose composta, compatível com o padrão de herança estabelecido para esta doença, o padrão autossômico recessivo. Com esta complementação, as variantes foram classificadas pelos critérios da ACMG como provavelmente patogênicas (c.710G>A). (c.374T>C). Este probando foi o único no qual o padrão de herança monogênico não foi o autossômico dominante, com risco de recorrência para os genitores desta criança de 25%.

Por ser uma doença ainda em delineamento e pelo fato de apresentar diversas características que se assemelham a uma RASoptia, ela deve ser incorporada entre seus diagnósticos diferenciais, particularmente para a SNLLAH, pelo envolvimento ectodérmico acentuado.

5.3.5. Deleção intersticial em 19p

Uma deleção de 1,16Mb em 19p13.3 de novo foi identificada no indivíduo (F10600-2) a partir do NGS e confirmada por array genômico.

Anormalidades de número de cópias (CNVs) na região subtelomérica do cromossomo 19 são raras. O cromossomo 19 é o que apresenta a maior densidade gênica entre todos os cromossomos, o que sugere que mesmo alterações pequenas possam comprometer o desenvolvimento. Recentemente, uma nova síndrome de microdelção/microduplicação envolvendo a região cromossômica em 19p13.3 foi caracterizada. No entanto, o intervalo cromossômico e, particularmente a menor região de sobreposição entre os 13 pacientes descritos (chr19:3979568-4131259; hg19), não é o mesmo presente no nosso paciente (Nevado et al., 2015).

No banco de dados de CNVs do DECEPHER, poucas deleções foram descritas envolvendo o segmento deletado em nosso paciente. Dentre elas, a que mais se aproxima é uma deleção de de 866Kb, de novo, envolvendo as posições genômicas (1272198-2138731), em um paciente do gênero masculino com anormalidades faciais e deficiência intelectual.

De fato, CNVs foram reportadas de forma muito restrita em indivíduos com fenótipos de uma RASopatia. Em 2014, Nowaczyk et al. descerveram sete pacientes com deleções de novo em 19p13.3, cuja região incluía o gene *MAP2K2,* que apresentavam características clínicas com sobreposição àquelas presentes em uma RASoptia. No entanto, a região com deleção no paciente desta casuística não continha o gene *MAP2K2*. Ainda, no intervalo cromossômico envolvido, nenhum gene associado a fenótipos mendelianos incluem uma RASopatia. Desta forma, é possível que um gene ou genes na região ainda não associados às RASopatias possa estar contribuindo para o seu fenótipo. Por outro lado, o fato do paciente apresentar um atraso grave do desenvolvimento neuropsicomotor/ deficiência intelectual deve decorrer da ação conjunta de outros genes na região.

5.4. Risco de recorrência nas famílias

No presente estudo, a quase totalidade das variantes encontradas foram em heterozigose. A transmissão vertical do fenótipo estava presente em oito famílias, sendo comprovado pelo teste molecular em quatro delas. Em uma única família,

irmãos provavelmente monozigóticos apresentam o fenótipo Noonan. Seus pais foram avaliados clinica e molecularmente e não apresentavam a variante. Desta forma, todos os pacientes confirmados por estudo molecular nesta casuística apresentam uma RASopatia com um padrão de herança autossômica dominante. Neste cenário, o risco de recorrência para um indivíduo com a SN é de 50%. Para os genitores de uma criança com RASopatia que não apresentam a variante, o risco de recorrência é menor que 1%, levando-se em consideração a possibilidade do mosaicismo gonadal. Este valor contrasta com aquele fornecido ao casal de uma criança com hipótese clínica inicial de SNLLAH (F11994-1). O estudo molecular revelou que este indivíduo apresentava duas variantes no gene *DPH1* em heterozigose composta, comprovado pelo estudo dos pais que eram, cada um, heterozigoto para uma única variante. Neste caso, o risco de recorrência para o casal é de 25%, compatível com um padrão de herança autossômico recessivo.

5.5. Considerações finais

Embora o conhecimento das bases moleculares das RASopatias cresceu de forma exponencial nos últimos anos, graças a essas novas técnicas de biologia molecular, seja no encontro de novas variantes em genes já conhecidamente associados às RASopatias, assim como na descoberta de novos genes, ainda não há um conhecimento total sobre as bases genéticas destas doenças, uma vez que pelo menos 20% dos pacientes clinicamente diagnosticados com a SN não apresentam variantes nos genes conhecidos. Desta forma, pesquisas nesta área ainda são importantes na tentativa de encontrar novos genes responsáveis pelas RASopatias. Neste cenário, os pacientes estudados pelo NGS através de um painel de genes já associados a estas síndromes ou mesmo pelo exoma e que não apresentam variantes identificadas, podem ser selecionados para futuros estudos na tentativa da identificação de novos genes associados às RASopatias.

Outro ponto que merece destaque é o fato de haver uma grande variabilidade na expressão fenotípica dentro das RASopatias, especialmente na síndrome de Noonan. É possível que variantes em outros genes da via RAS/MAPK produzam um efeito aditivo no fenótipo, compatível com um modelo não mais monogênico, mas oligogênico. A ocorrência de variantes em mais de um gene da via RAS/MAPK foi

descrita em poucas ocasiões na literatura, incluindo uma publicação deste grupo (Brasil et al., 2010). No emprego do sequenciamento clássico de Sanger para uma doença monogênica com heterogeneidade genetica, o estudo é geralmente sequencial. Desta forma, o fato de se encontrar uma mutação em um gene, já é suficiente para estabelecer o diagnóstico e os estudos cessam neste ponto, sem análise de outros genes. O NGS, ao realizar a análise conjunta destes genes, permite avaliar um número muito maior de dados genômicos. Desta forma, Chen et al. (2014) avaliaram 27 indivíduos com RASopatias por NGS e observaram que todos apresentavam variantes em mais de um gene da via RAS/MAPK e, embora em 25 deles uma variante única, rara, parecia explicar o fenótipo, em dois indivíduos duas mutações distintas pareciam contribuir para o fenótipo. Futuros estudos avaliando de forma mais global os dados genômicos destes pacientes por NGS são importantes para estabelecer se há e quais são os possíveis outros fatores genéticos que modulam a variabilidade clínica apresentada por estes pacientes.

6. CONCLUSÃO

A técnica do seqüenciamento de nova geração foi efetiva em mostrar variantes pontuais e confirmar a hipótese clínica de uma RASopatia, com um positivade ao redor de 60%. Ainda, o seqüenciamento do exoma permitiu estabelecer um diagnóstico preciso em inidvíduos afetados por outras doenças monogênicas, cujos fenótipos se sobrepõem às RASopatias.

Variantes raras, novas, em genes já reconhecidos como responsáveis pelas RASopatias foram encontradas em *MAP2K2* e *NF1*.

Uma variante em heterozigose em *ACTC1*, um gene ainda não associado ao fenótipo Noonan, foi identificada apenas no probando em um caso isolado. Este achado reforça a possibilidade do gene *ACTC1* desempenhar uma função mais ampla no desenvolvimento embrionário do que apenas restrita ao tecido cardíaco.

A associação entre os achados clínicos dos indivíduos com SN desta casuística, separados por grupos de genes, mostraram diferenças estatisticamente significantes em dois achados cardinais na síndrome: a baixa estatura e os tipos de anomalias cardíacas, estenose pulmonar e cariomiopatia hipertrófica, semelhantes aos dados da literatura.

Achados clínicos distintos foram observados em uma variante mais rara em *HRAS* e nos genes *NRAS* e *PPP1CB*. Estes achados contribuem para uma caracterização clinica mais detalhada, com expansão do espectro fenotípico.

7. ANEXOS

Anexo 1: Achados clínicos dos probandos com variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS.

PACIENTE	BE 0. NÃO 1. SIM	DISMORFIMOS FACIAIS 0. NÃO 1. SIM	PESCOÇO CURTO E OU ALADO 0. NÃO 1. SIM	CARDIOPATIA 0. NÃO 1. MIOCH C/ OU S/ EPV 2. EPV ou EPSV C/ OU S/ OUTRA LESÃO 3. CIA E/OU CIV 4. OUTROS	DEFORMIDADE ESTERNAL 0. NÃO 1. EXCAVATUM 2. CARINATUM 3. EXCAVATUM/CARINATUM	CRIPTORQUIDIA 0. NÃO 1. SIM	DISTÚRBIOS HEMATOLÓGICOS 0. NÃO 1. SIM	OUTROS ACHADOS
CC722	1	0	1	2 + CIA + CIV	3	1	0	
CC1169	1	1	1	2 + CIA	0		Deficiência dos fatores XI e XII	
F11963-1	1	1	1	2 + CIA + CIV + cleft mitral	0	1		
CC4902	1	1	1	2 (EPSV) + prolapso da valva mitral	0	0		
F11868-1	1	1	1	2 + CIA	2			
F9755-1	1	1	1	4 - FOP	1		0	
F12100-1	1	1	1	2 + CIA	0			
CC726	1	1	1	2 + CIA	3		0	
F10838-1	0	1	1	2 + CIA	3	1	0	
F11391-1	1	1	1	3 (CIA)	0	0	0	
CC5458	1	1	1	0	0	1	0	
CC5407	0	1	0	2	0	0		
F11621-1	1	1	1	4 - defeito do septo AV	0		0	
F12101-1	1	1	1	2 + CIA	2			
CC2016	1	1	1	4 - FOP + estenose discreta da artéria pulmonar	0	1		
F119621	1	1	1	2 (EPV + EPSV)	3			
CC5680	1	1	0	2 + CIV	0	1	0	
F113031	1	1	1	4 - FOP + valva aórtica espessada	0			
F1078211	1	1	0	0	0	1	0	
CC5657	0	1	1	2	0		0	
CC5530	1	1	1	2 + CIA	2	1	0	
F11276-1	1	1	0	1	1	1	0	8 manchas café com leite, perda auditiva neurossensorial profunda
CC1158	1	0	1	3 (CIA)	0	1	0	
CC3770	0	1	0	2	0		0	
CC4388	1	1	1	4 - FOP	2	0	0	
F12047-1	1	1	1	3 (CIA)	2	0	0	
CC5608	1	1	1	2 + CIA	2	1	NR	
F11541-1	0	1	1	1 + EPV + FOP		0	0	
F11869-1	0	1	1	2 (EPV + EPSV)	0	0		hiperqueratose folicular em face
CC5746	1	1	1	2 + CIV	0		0	Pneumonias de repetição com dificuldade de degluitção: gastrostomia
F10286-1	1	1	1	1	1	0	0	
F10303-1	1	1	1	1	0	0	0	
F10577-1	0	1	0	2 + CIA	1	0	0	

CC5661	1	1	1	1 + EPV + CIA	0			Obito 22/06/2013
F10167-1	1	1	1	1	0			hipoglicemia de dificil controle e colabamento da traqueia: traquesotomia, hamartoma hipotalâmico
CC5100	1	1	1	0	0	0	0	
CC4602	1	1	1	4 - proalpso da valva mitral	0		0	face com hipoplasia da crista orbitária + hidrocefalia
F11444-1	0	1	1	4 - prolapso da valva mitral	1		NA	linfangioma pulmonar
CC883	1	1	1	2 + CIA	3	1	Deficiência de fator VIII	atraso grave do DNPM
F10275-1	1	1	1	0	0			atraso do DNPM, escoliose grave, cabelos de crescimento lento, hidrocefalia, Chiari tipo I e hidrosseringomielia, papiloma perinasal na adolescência
F10280-1	1	1	1	1	0	1		atraso importante do DNPM; gastrostomia até os 2 anos de idade
F10178-1	1	1	1	1	0		0	
F9713-1	1	1	1	1	0	0		grande dificuldade em ganhar peso
CC2492	1	1	0	0	3	1	0	atraso acentuado do DNPM, hiperqueratose folicular e nevos
CC893	0	1	1	1	0		0	atraso acentuado do DNPM + hiperqueratose palmo-plantar e nevos
F11874-1	1	1	0	0	0		0	atraso acentuado do DNPM + gastrostomia até a atualidade (11 anos) com aversão alimentar +nevos
F11620-1	1	1		2		0	0	atraso do DNPM/DI + epilepsia
F11108-1	1	1	1	2			0	gastrostomia até o presente (6 anos) + cílios e sobrancelhas esparsas + nistagmo + epilepsia
CC5731	1	1	1	2 + CIA	1		0	atraso do DNPM + dificuldade alimentar
F9186-1	0	1	1	2 (EPV + EPSV)	3	1		Macrocefalia com dilatação ventricular + atraso grave da fala + nevos
CC5059	1	1	1	0	0		0	evoluiu com atraso grave do DNPM
F11961-1	1	1	1	2 - valva pulmonar espessada	0			Dificuldade alimentar, atraso motor+ hiperqueratose folicular em face
F10261-1	1	1	1	1	3			atraso acentuado do DNPM + crista orbitária hipoplásica + hiperquertose folicular + nevos + tu de células gigantes em osso da mão E
F11839-1	0	1	1	4 - FOP	1		0	hipoplasia das cristas orbitárias + sobrancelhas e cílios esparsos + atraso do DNPM/DI + hiperqueratose folicular, nervos, eplepsia
CC5105	1	0		0		0	0	manchas CAL + efélides inguinais e axilares + nódulos de Lisch
CC5088	1	1	0		0	0		manchas CAL + efélides em axilas
F10159-1						0		Dismorfismos faciais sugestivos da síndrome de Noonan + manchas CAL + efélides
CC5072	0	1	1	4 - insuficiência tricúspide discreta	0	0	0	
CC5217	0	1	1	0	3	1	0	cabelos finos e esparsos + craniossinostose
F10557-1	0	1	1	4 - anomalia de Ebstein + CIA	1	1	0	
CC5114	0	1	1	3 (CIV)	1	0		Agenesia do corpo caloso
CC5305	0	1	1	3 (CIA)	2	1	0	atraso acentaudo do DNPM + cabelos esparsos + hipoplasia da patela
CC1471	1	1	0	4 - ectasia da raiz da aorta e prolapso da valva mitral	0	0	na	atraso do DNPM + dentes espaçados + eversão da pálpebra inferior
F11994-1	1	1	0	3 (CIA) + valva pulmonar displásica	0			cabelos esparsos + perda auditiva de grau severo e anomalia de Dandy-Walker
F10600-2	0	1	1	0	1	1	0	atraso acentuado do DNPM/DI + hiperqueratose folicular em face

BE: Baixa estatura; CIA: comunicação interatrial, CIV: comunicação interventricular; EPV: estenose da valva pulmonar, EPSV: estenose pulmonar supravalvar, FOP: forame oval pérvio, MIOCH: miocardiopatia hipertrófica.

8. REFERÊNCIAS

Alazami AM, Patel N, Shamseldin HE, Anazi S, Al-Dosari MS, Alzahrani F, Hijazi H, Alshammari M, Aldahmesh MA, Salih MA, Faqeih E, Alhashem A, Bashiri FA, Al-Owain M, Kentab AY, Sogaty S, Al Tala S, Temsah MH, Tulbah M, Aljelaify RF, Alshahwan SA, Seidahmed MZ, Alhadid AA, Aldhalaan H, AlQallaf F, Kurdi W, Alfadhel M, Babay Z, Alsogheer M, Kaya N, Al-Hassnan ZN, Abdel-Salam GM, Al-Sannaa N, Al Mutairi F, El Khashab HY, Bohlega S, Jia X, Nguyen HC, Hammami R, Adly N, Mohamed JY, Abdulwahab F, Ibrahim N, Naim EA, Al-Younes B, Meyer BF, Hashem M, Shaheen R, Xiong Y, Abouelhoda M, Aldeeri AA, Monies DM, Alkuraya FS.Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families.Cell Rep. 2015 Jan 13;10(2):148-61.

Allanson JE. Noonan Syndrome. J Med Genet 1987;24:9-13.

Altmüller F, Lissewski C, Bertola D, Flex E, Stark Z, Spranger S, Baynam G, Buscarilli M, Dyack S, Gillis J, Yntema HG, Pantaleoni F, van Loon RL, MacKay S, Mina K, Schanze I, Tan TY, Walsh M, White SM, Niewisch MR, García-Miñaúr S, Plaza D, Ahmadian MR, Cavé H, Tartaglia M, Zenker M. Genotype and phenotype spectrum of NRAS germline variants. Eur J Hum Genet. 2017 Jun;25(7):823-831.

Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. Am J Hum Genet. 2013 Jul 11;93(1):173-80.

Aoki Y, Niihori T, Inoue S, Matsubara Y. Recent advances in RASopathies. J Hum Genet. 2016 Jan;61(1):33-9.

Arroyo-Carrera I, Solo de Zaldivar-Tristancho M, Martin-Fernandez R, Vera-Torres M, Gonzalez de Buitrago-Amigo JF, Botet-Rodriguez J. [RIT1: a novel gene associated with Noonan syndrome]. Rev Neurol. 2016 Oct 16;63(8):358-362.

Augière C, Mégy S, El Malti R, Boland A, El Zein L, Verrier B, Mégarbané A, Deleuze JF, Bouvagnet P. A Novel Alpha Cardiac Actin (ACTC1) Mutation Mapping to a Domain in Close Contact with Myosin Heavy Chain Leads to a Variety of Congenital Heart Defects, Arrhythmia and Possibly Midline Defects. PLoS One. 2015 Jun 10;10(6):e0127903.

Bertola D, Buscarilli M, Stabley DL, Baker L, Doyle D, Bartholomew DW, Sol-Church K, Gripp KW. Phenotypic spectrum of Costello syndrome individuals harboring the rare HRAS mutation p.Gly13Asp. Am J Med Genet A. 2017 May;173(5):1309-1318.

Bertola DR, Pereira AC, Albano LM, De Oliveira PS, Kim CA, Krieger JE. PTPN11 gene analysis in 74 Brazilian patients with Noonan syndrome or Noonan-like phenotype. Genet Test. 2006 Fall;10(3):186-91.

Bertola DR, Pereira AC, Albano LM, De Oliveira PS, Kim CA, Krieger JE. PTPN11 gene analysis in 74 Brazilian patients with Noonan syndrome or Noonan-like phenotype. Genet Test. 2006 Fall;10(3):186-91.

Bertola DR, Yamamoto GL, Almeida TF, Buscarilli M, Jorge AA, Malaquias AC, Kim CA, Takahashi VN, Passos-Bueno MR, Pereira AC. Further evidence of the importance of RIT1 in Noonan syndrome. Am J Med Genet A. 2014 Nov;164A(11):2952-7.

Bhoj EJ, Yu Z, Guan Q, Ahrens-Nicklas R, Cao K, Luo M, Tischler T, Deardorff MA, Zackai E, Santani AB. Phenotypic predictors and final diagnoses in patients referred

for RASopathy testing by targeted next-generation sequencing. Genet Med. 2016 Oct 20.

Bigenzahn JW, Collu GM, Kartnig F, Pieraks M, Vladimer GI, Heinz LX, Sedlyarov V, Schischlik F, Fauster A, Rebsamen M, Parapatics K, Blomen VA, Müller AC, Winter GE, Kralovics R, Brummelkamp TR, Mlodzik M, Superti-Furga G. LZTR1 is a regulator of RAS ubiquitination and signaling. Science. 2018 Dec 7;362(6419):1171-1177.

Check Hayden E. Technology: The $ 1,000 genome. Nature. 2014; 507 (7492): 294-295.

Chen H, Li X, Liu X, Wang J, Zhang Z, Wu J, Huang M, Guo Y, Li F, Wang X, Fu L. Clinical and mutation profile of pediatric patients with RASopathy-associated hypertrophic cardiomyopathy: results from a Chinese cohort. Orphanet J Rare Dis. 2019 Feb 7;14(1):29.

Chen PC, Yin J, Yu HW, Yuan T, Fernandez M, Yung CK, Trinh QM, Peltekova VD, Reid JG, Tworog-Dube E, Morgan MB, Muzny DM, Stein L, McPherson JD, Roberts AE, Gibbs RA, Neel BG, Kucherlapati R. Next-generation sequencing identifies rare variants associated with Noonan syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug 5;111(31):11473-8.

Chen PC, Yin J, Yu HW, Yuan T, Fernandez M, Yung CK, Trinh QM, Peltekova VD, Reid JG, Tworog-Dube E, Morgan MB, Muzny DM, Stein L, McPherson JD, Roberts AE, Gibbs RA, Neel BG, Kucherlapati R. Next-generation sequencing identifies rare variants associated with Noonan syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug 5;111(31):11473-8.

Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, Harrell TM, McMillin MJ, Wiszniewski W, Gambin T, Coban Akdemir ZH, Doheny K, Scott AF, Avramopoulos D, Chakravarti A, Hoover-Fong J, Mathews D, Witmer PD, Ling H,

Hetrick K, Watkins L, Patterson KE, Reinier F, Blue E, Muzny D, Kircher M, Bilguvar K, López-Giráldez F, Sutton VR, Tabor HK, Leal SM, Gunel M, Mane S, Gibbs RA, Boerwinkle E, Hamosh A, Shendure J, Lupski JR, Lifton RP, Valle D, Nickerson DA; Centers for Mendelian Genomics., Bamshad MJ. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. Am J Hum Genet. 2015 Aug 6;97(2):199-215.

Čizmárová M, Hlinková K, Bertok S, Kotnik P, Duba HC, Bertalan R, Poločková K, Košťálová Ľ, Pribilincová Z, Hlavatá A, Kovács L, Ilenčíková D. New Mutations Associated with Rasopathies in a Central European Population and Genotype-Phenotype Correlations. Ann Hum Genet. 2016 Jan;80(1):50-62.

Čizmárová M, Hlinková K, Bertok S, Kotnik P, Duba HC, Bertalan R, Poločková K, Košťálová Ľ, Pribilincová Z, Hlavatá A, Kovács L, Ilenčíková D. New Mutations Associated with Rasopathies in a Central European Population and Genotype-Phenotype Correlations. Ann Hum Genet. 2016 Jan;80(1):50-62.

Elalaoui SC, Kraoua L, Liger C, Ratbi I, Cavé H, Sefiani A. Germinal mosaicism in Noonan syndrome: A family with two affected siblings of normal parents. Am J Med Genet A. 2010 Nov;152A(11):2850-3.

Gelb BD, Tartaglia M. Noonan syndrome and related disorders: dysregulated RAS-mitogen activated protein kinase signal transduction. Hum Mol Genet. 2006 Oct 15;15 Spec No 2:R220-6.

Gos M, Fahiminiya S, Poznański J, Klapecki J, Obersztyn E, Piotrowicz M, Wierzba J, Posmyk R, Bal J, Majewski J.Contribution of RIT1 mutations to the pathogenesis of Noonan syndrome: four new cases and further evidence of heterogeneity. Am J Med Genet A. 2014 Sep;164A(9):2310-6.

Gripp KW, Aldinger KA, Bennett JT, Baker L, Tusi J, Powell-Hamilton N, Stabley D, Sol-Church K, Timms AE, Dobyns WB. A novel rasopathy caused by recurrent de novo missense mutations in PPP1CB closely resembles Noonan syndrome with loose anagen hair. Am J Med Genet A. 2016;170(9):2237-47.

Heather JM, Chain B. The sequence of equencers: The history of sequencing DNA. Genomics. 2016 Jan;107(1):1-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003. Epub 2015 Nov 10.

Ilkovski B, Clement S, Sewry C, North KN, Cooper ST. Defining alpha-skeletal and alpha-cardiac actin expression in human heart and skeletal muscle explains the absence of cardiac involvement in ACTA1 nemaline myopathy. Neuromuscul Disord. 2005 Dec;15(12):829-35.

Johnston JJ1, van der Smagt JJ2, Rosenfeld JA3, Pagnamenta AT4, Alswaid A5, Baker EH6, Blair E7, Borck G8, Brinkmann J9, Craigen W3, Dung VC10, Emrick L11, Everman DB12, van Gassen KL2, Gulsuner S13, Harr MH14, Jain M15, Kuechler A16, Leppig KA17, McDonald-McGinn DM18, Can NTB10, Peleg A19, Roeder ER20, Rogers RC12, Sagi-Dain L19, Sapp JC1, Schäffer AA21, Schanze D9, Stewart H7, Taylor JC4, Verbeek NE2, Walkiewicz MA3, Zackai EH18, Zweier C22; Members of the Undiagnosed Diseases Network, Zenker M9, Lee B3, Biesecker LG23. Autosomal recessive Noonan syndrome associated with biallelic LZTR1 variants. Genet Med. 2018 Oct;20(10):1175-1185.

Jongmans M, Sistermans EA, Rikken A, Nillesen WM, Tamminga R, Patton M, Maier EM, Tartaglia M, Noordam K, van der Burgt I. Genotypic and phenotypic characterization of Noonan syndrome: new data and review of the literature. Am J Med Genet A. 2005 Apr 15;134A(2):165-70.

Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, Herman GE, Hufnagel SB, Klein TE, Korf BR, McKelvey KD, Ormond KE, Richards CS, Vlangos CN, Watson M, Martin CL, Miller DT. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics.Genet Med. 2017;19:249-255.

Kennedy J, Goudie D, Blair E, Chandler K, Joss S, McKay V, Green A, Armstrong R, Lees M, Kamien B, Hopper B, Tan TY, Yap P, Stark Z, Okamoto N, Miyake N, Matsumoto N, Macnamara E, Murphy JL, McCormick E, Hakonarson H, Falk MJ, Li

D, Blackburn P, Klee E, Babovic-Vuksanovic D, Schelley S, Hudgins L, Kant S, Isidor B, Cogne B, Bradbury K, Williams M, Patel C, Heussler H, Duff-Farrier C, Lakeman P, Scurr I, Kini U, Elting M, Reijnders M, Schuurs-Hoeijmakers J, Wafik M, Blomhoff A, Ruivenkamp CAL, Nibbeling E, Dingemans AJM, Douine ED, Nelson SF; DDD Study,, Arboleda VA, Newbury-Ecob R. KAT6A Syndrome: genotype-phenotype correlation in 76 patients with pathogenic KAT6A variants. Genet Med. 2018 Sep 24.

Koczkowska M, Chen Y, Callens T, Gomes A, Sharp A, Johnson S, Hsiao MC, Chen Z, Balasubramanian M, Barnett CP, Becker TA, Ben-Shachar S, Bertola DR, Blakeley JO, Burkitt-Wright EMM, Callaway A, Crenshaw M, Cunha KS, Cunningham M, D'Agostino MD, Dahan K, De Luca A, Destrée A, Dhamija R, Eoli M, Evans DGR, Galvin-Parton P, George-Abraham JK, Gripp KW, Guevara-Campos J, Hanchard NA, Hernández-Chico C, Immken L, Janssens S, Jones KJ, Keena BA, Kochhar A, Liebelt J, Martir-Negron A, Mahoney MJ, Maystadt I, McDougall C, McEntagart M, Mendelsohn N, Miller DT, Mortier G, Morton J, Pappas J, Plotkin SR, Pond D, Rosenbaum K, Rubin K, Russell L, Rutledge LS, Saletti V, Schonberg R, Schreiber A, Seidel M, Siqveland E, Stockton DW, Trevisson E, Ullrich NJ, Upadhyaya M, van Minkelen R, Verhelst H, Wallace MR, Yap YS, Zackai E, Zonana J, Zurcher V, Claes K, Martin Y, Korf BR, Legius E, Messiaen LM. Genotype-Phenotype Correlation in NF1: Evidence for a More Severe Phenotype Associated with Missense Mutations Affecting NF1 Codons 844-848. Am J Hum Genet. 2018 Jan 4;102(1):69-87. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.12.001.

Koenighofer M, Hung CY, McCauley JL, Dallman J, Back EJ, Mihalek I, Gripp KW, Sol-Church K, Rusconi P, Zhang Z, Shi GX, Andres DA, Bodamer OA. Mutations in RIT1 cause Noonan syndrome - additional functional evidence and expanding the clinical phenotype. Clin Genet. 2016 Mar;89(3):359-66.

Koh AL, Tan ES, Brett MS, Lai AHM, Jamuar SS, Ng I, Tan EC. The spectrum of genetic variants and phenotypic features of Southeast Asian patients with Noonan syndrome. Mol Genet Genomic Med. 2019 Feb 19:e581.

Koh AL, Tan ES, Brett MS, Lai AHM, Jamuar SS, Ng I, Tan EC. The spectrum of genetic variants and phenotypic features of Southeast Asian patients with Noonan syndrome. Mol Genet Genomic Med. 2019 Feb 19:e581.

Kouz K, Lissewski C, Spranger S, Mitter D, Riess A, Lopez-Gonzalez V, Lüttgen S, Aydin H, von Deimling F, Evers C, Hahn A, Hempel M, Issa U, Kahlert AK, Lieb A, Villavicencio-Lorini P, Ballesta-Martinez MJ, Nampoothiri S, Ovens-Raeder A, Puchmajerová A, Satanovskij R, Seidel H, Unkelbach S, Zabel B, Kutsche K, Zenker M. Genotype and phenotype in patients with Noonan syndrome and a RIT1 mutation. Genet Med. 2016 Dec;18(12):1226-1234.

Kouz K, Lissewski C, Spranger S, Mitter D, Riess A, Lopez-Gonzalez V, Lüttgen S, Aydin H, von Deimling F, Evers C, Hahn A, Hempel M, Issa U, Kahlert AK, Lieb A, Villavicencio-Lorini P, Ballesta-Martinez MJ, Nampoothiri S, Ovens-Raeder A, Puchmajerová A, Satanovskij R, Seidel H, Unkelbach S, Zabel B, Kutsche K, Zenker M. Genotype and phenotype in patients with Noonan syndrome and a RIT1 mutation. GeneMed.2016 Dec;18(2):1226-1234.

Lepri FR, Scavelli R, Digilio MC, Gnazzo M, Grotta S, Dentici ML, Pisaneschi E, Sirleto P, Capolino R, Baban A, Russo S, Franchin T, Angioni A, Dallapiccola B. Diagnosis of Noonan syndrome and related disorders using target next generation sequencing. BMC Med Genet. 2014 Jan 23;15:14.

Lin Liu, Yinhu Li, Siliang Li, Ni Hu, Yimin He, Ray Pong, Danni Lin, Lihua Lu, and Maggie Law. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2012, Article ID 251364, 11 pages http://dx.doi.org/10.1155/2012/251364 Review Article.

Mardis ER. Next-Generation Sequencing Platforms. Anu.Rev.Anal.Chem 2013; 6:287-303.

Martinelli S, Krumbach OHF, Pantaleoni F, Coppola S, Amin E, Pannone L, Nouri K, Farina L, Dvorsky R, Lepri F, Buchholzer M, Konopatzki R, Walsh L, Payne K, Pierpont ME, Vergano SS, Langley KG, Larsen D, Farwell KD, Tang S, Mroske C,

Gallotta I, Di Schiavi E, Della Monica M, Lugli L, Rossi C, Seri M, Cocchi G, Henderson L, Baskin B, Alders M, Mendoza-Londono R, Dupuis L, Nickerson DA, Chong JX; University of Washington Center for Mendelian Genomics, Meeks N, Brown K, Causey T, Cho MT, Demuth S, Digilio MC, Gelb BD, Bamshad MJ, Zenker M, Ahmadian MR, Hennekam RC, Tartaglia M, Mirzaa GM. Functional Dysregulation of CDC42 Causes Diverse Developmental Phenotypes. Am J Hum Genet. 2018 Feb 1;102(2):309-320.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res.1988; 16:215.

Milosavljević D, Overwater E, Tamminga S, de Boer K, Elting MW, van Hoorn ME, Rinne T, Houweling AC. Two cases of RIT1 associated Noonan syndrome: Further delineation of the clinical phenotype and review of the literature. Am J Med Genet A. 2016 Jul;170(7):1874-80.

Miyake N, Ozasa S, Mabe H, Kimura S, Shiina M, Imagawa E, Miyatake S, Nakashima M, Mizuguchi T, Takata A, Ogata K, Matsumoto N. A novel missense mutation affecting the same amino acid as the recurrent PACS1 mutation in Schuurs-Hoeijmakers syndrome.Clin Genet. 2018 Apr;93(4):929-930.

Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. Mol Genet Metab. 2013 Sep-Oct;110(1-2):3-24.

Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. Mol Genet Metab. 2013 Sep-Oct;110(1-2):3-24. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.04.024. Epub 2013 May 11.

Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Hinkel GK, Tinschert S, Hoeltzenbein M, Ropers HH, Kalscheuer VM. Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. Eur J Hum Genet. 2003 Feb;11(2):201-6.

Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Hinkel GK, Tinschert S, Hoeltzenbein M, Ropers HH, Kalscheuer VM. Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. Eur J Hum Genet. 2003 Feb;11(2):201-6.

Nemcikova M, Vejvalkova S, Fencl F, Sukova M, Krepelova A. A novel heterozygous RIT1 mutation in a patient with Noonan syndrome, leukopenia, and transient myeloproliferation-a review of the literature. Eur J Pediatr. 2016 Apr;175(4):587-92.

Nevado J, Rosenfeld JA, Mena R, Palomares-Bralo M, Vallespín E, Ángeles Mori M, Tenorio JA, Gripp KW, Denenberg E, Del Campo M, Plaja A, Martín-Arenas R, Santos-Simarro F, Armengol L, Gowans G, Orera M, Sanchez-Hombre MC, Corbacho-Fernández E, Fernández-Jaén A, Haldeman-Englert C, Saitta S, Dubbs H, Bénédicte DB, Li X, Devaney L, Dinulos MB, Vallee S, Crespo MC, Fernández B, Fernández-Montaño VE, Rueda-Arenas I, de Torres ML, Ellison JW, Raskin S, Venegas-Vega CA, Fernández-Ramírez F, Delicado A, García-Miñaúr S, Lapunzina P. PIAS4 is associated with macro/microcephaly in the novel interstitial 19p13.3 microdeletion/microduplication syndrome. Eur J Hum Genet. 2015 Dec;23(12):1615-26.

Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. Nat Genet. 2006 Mar;38(3):294-6.

Noonan JA. Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associates congenital heart disease. Am J Dis Child. 1968; 116:373-80.

Nora JJ, Nora AH, Sinha AK, Spangler RD, Lubs HA. The Ullrich- Noonan syndrome (Turner phenotype). Am J Dis Child. 1974; 127:48-55.

Nowaczyk MJ, Thompson BA, Zeesman S, Moog U, Sanchez-Lara PA, Magoulas PL, Falk RE, Hoover-Fong JE, Batista DA, Amudhavalli SM, White SM, Graham GE, Rauen KA. Deletion of MAP2K2/MEK2: a novel mechanism for a RASopathy? Clin Genet. 2014 Feb;85(2):138-46.

Pagnamenta AT1, Kaisaki PJ1, Bennett F1, Burkitt-Wright E2, Martin HC3, Ferla MP1, Taylor JM4, Gompertz L2, Lahiri N5, Tatton-Brown K5, Newbury-Ecob R6, Henderson A7, Joss S8, Weber A9, Carmichael J10, Turnpenny PD11, McKee S12, Forzano F13, Ashraf T13, Bradbury K13, Shears D14, Kini U14, de Burca A14; DDD Study3, Blair E14, Taylor JC1, Stewart H14. Delineation of dominant and recessive forms of LZTR1-associated Noonan syndrome. Clin Genet. 2019 Mar 12. doi: 10.1111/cge.13533. [Epub ahead of print].

Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, Pogna EA, Schackwitz W, Ustaszewska A, Landstrom A, Bos JM, Ommen SR, Esposito G, Lepri F, Faul C, Mundel P, López Siguero JP, Tenconi R, Selicorni A, Rossi C, Mazzanti L, Torrente I, Marino B, Digilio MC, Zampino G, Ackerman MJ,Dallapiccola B, Tartaglia M, Gelb BD. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. Nat Genet. 2007 Aug;39(8):1007-12.

Peltonem L e McKusick VA. Dissecting Human Disease in the Postgenomic Era. Science 2001; 291; 1224-1229.

Ramond F, Duband S, Croisille P, Cavé H, Teyssier G, Adouard V, Touraine R. Expanding the cardiac spectrum of Noonan syndrome with RIT1 variant: Left main coronary artery atresia causing sudden death. Eur J Med Genet. 2017 Jun;60(6):299-302.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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;17:405-24.

Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome. Lancet. 2013;381(9863):333-42.

Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, Roberts AE, Robinson W, Takemoto CM, Noonan JA. Pediatrics. 2010 Oct;126(4):746-RS, Gelb BD. 2001. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. Nat Genet 29:465–468.

Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J. Mol. Biol. 94:441–48.

Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Böll S, Klein C, Bollag G, van der Burgt I, Musante L, Kalscheuer V, Wehner LE, Nguyen H, West B, Zhang KY, Sistermans E, Rauch A, Niemeyer CM, Shannon K, Kratz CP. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. Nat Genet. 2006 Mar;38(3):331-6.

Schuurs-Hoeijmakers JH, Landsverk ML, Foulds N, Kukolich MK, Gavrilova RH, Greville-Heygate S, Hanson-Kahn A, Bernstein JA, Glass J, Chitayat D, Burrow TA, Husami A, Collins K, Wusik K, van der Aa N, Kooy F, Brown KT, Gadzicki D, Kini U, Alvarez S, Fernández-Jaén A, McGehee F, Selby K, Tarailo-Graovac M, Van Allen M, van Karnebeek CD, Stavropoulos DJ, Marshall CR, Merico D, Gregor A, Zweier C, Hopkin RJ, Chu YW, Chung BH, de Vries BB, Devriendt K, Hurles ME, Brunner HG; DDD study. Clinical delineation of the PACS1-related syndrome--Report on 19 patients.Am J Med Genet A. 2016 Mar;170(3):670-5.

Schuurs-Hoeijmakers JH, Oh EC, Vissers LE, Swinkels ME, Gilissen C, Willemsen MA, Holvoet M, Steehouwer M, Veltman JA, de Vries BB, van Bokhoven H, de Brouwer AP, Katsanis N, Devriendt K, Brunner HG. Recurrent de novo mutations in PACS1 cause defective cranial-neural-crest migration and define a recognizable intellectual-disability syndrome. Am J Hum Genet. 2012 Dec 7;91(6):1122-7.

Shaw AC, Kalidas K, Crosby AH, Jeffery S, Patton MA. The natural history of Noonan syndrome: a long-term follow-up study. Arch Dis Child. 2007 Feb;92(2):128-32.

Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, Waterston RH. DNA sequencing at 40: past, present and future. Nature. 2017 Oct 19;550(7676):345-353.

Shingo T, Shin-ichi I, Sachiko MT, Katsuhisa M, Yasumi N, Tetsuya N, et al. New Noonan syndrome model mice with RIT1 mutation exhibit cardiac hypertrophy and susceptibility to β -adrenergic stimulation-induced cardiacbrosis.EBioMedicine 019.https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.014.

Steklov M, Pandolfi S, Baietti MF, Batiuk A, Carai P, Najm P, Zhang M, Jang H, Renzi F, Cai Y, Abbasi Asbagh L, Pastor T, De Troyer M, Simicek M, Radaelli E, Brems H, Legius E, Tavernier J, Gevaert K, Impens F, Messiaen L, Nussinov R, Heymans S, Eyckerman S Sablina AA. Mutations in LZTR1 drive human disease by dysregulating RAS ubiquitination. Science. 2018 Dec 7;362(6419):1177-1182.

Stephan Pabinger,*Andreas Dander,Maria Fischer, Rene Snajder, Michael Sperk, Mirjana Efremova,*Birgit Krabichler, Michael R. Speicher, Johannes Zschocke, and Zlatko Trajanoski. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. Brief Bioinform. 2014 Mar; 15(2): 256–278.

Tafazoli A, Eshraghi P, Pantaleoni F, Vakili R, Moghaddassian M, Ghahraman M, Muto V, Paolacci S, Golyan FF, Abbaszadegan MR. Novel mutations and their genotype-phenotype correlations in patients with Noonan syndrome, using next-generation sequencing. Adv Med Sci. 2018 Mar;63(1):87-93.

Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. Noonan syndrome and clinically related disorders. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011 Feb;25(1):161-79.

Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, Brunner HG, Bertola DR, Crosby A, Ion A, Kucherlapati RS, Jeffery S, Patton MA, Gelb BD. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype- phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. Am J Hum Genet. 2002 Jun;70(6):1555-63.

Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, Brunner HG, Bertola DR, Crosby A, Ion A, Kucherlapati RS, Jeffery S, Patton MA, Gelb BD. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. Am J Hum Genet. 2002 Jun;70(6):1555-63.

Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, van der Burgt I, Crosby AH, Ion A, Jeffery S, Kalidas K, Patton MA, Kucherlapati RS, Gelb BD. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. Nat Genet. 2001 Dec;29(4):465-8.

Tidyman WE, Rauen KA. Expansion oh the RASopathies.Curr Genet Med Rep.2016 Sep;4(3):57-64.

Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. CurrOpin Genet Dev. 2009;19(3):230-6.

Trevisson E, Morbidoni V, Forzan M, Daolio C, Fumini V, Parrozzani R, Cassina M, Midena E, Salviati L, Clementi M.The Arg1038Gly missense variant in the NF1 gene causes a mild phenotype without neurofibromas. Mol Genet Genomic Med. 2019 May;7(5):e616.

Urreizti R, Mayer K, Evrony GD, Said E, Castilla-Vallmanya L, Cody NAL, Plasencia G, Gelb BD, Grinberg D, Brinkmann U, Webb BD, Balcells S. DPH1 syndrome: two novel variants and structural and functional analyses of seven missense variants identified in syndromic patients. Eur J HumGenet. 2019 Mar 15.

Van Der Burgt I, Berends E, Lommen E, Van Beersum S, Hamel B, Mariman E. Clinical and molecular studies in a large dutch family with Noona syndrome. Am J Med Genet. 1994; 53(2):187-91.

Verloes A, Di Donato N, Masliah-Planchon J, Jongmans M, Abdul-Raman OA, Albrecht B, Allanson J, Brunner H, Bertola D, Chassaing N, David A, Devriendt K, Eftekhari P, Drouin-Garraud V, Faravelli F, Faivre L, Giuliano F, Guion Almeida L,

Juncos J, Kempers M, Eker HK, Lacombe D, Lin A, Mancini G, Melis D, Lourenço CM, Siu VM, Morin G, Nezarati M, Nowaczyk MJ, Ramer JC, Osimani S, Philip N, Pierpont ME, Procaccio V, Roseli ZS, Rossi M, Rusu C, Sznajer Y, Templin L, Uliana V, Klaus M, Van Bon B, Van Ravenswaaij C, Wainer B, Fry AE, Rump A, Hoischen A, Drunat S, Rivière JB, Dobyns WB, PilzDT.Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome: delineation of the spectrum in 42 cases.Eur J Hum Genet. 2015 Mar;23(3):292-301.

Verloes A, Di Donato N, Masliah-Planchon J, Jongmans M, Abdul-Raman OA, Albrecht B, Allanson J, Brunner H, Bertola D, Chassaing N, David A, Devriendt K, Eftekhari P, Drouin-Garraud V, Faravelli F, Faivre L, Giuliano F, Guion Almeida L, Juncos J, Kempers M, Eker HK, Lacombe D, Lin A, Mancini G, Melis D, Lourenço CM, Siu VM, Morin G, Nezarati M, Nowaczyk MJ, Ramer JC, Osimani S, Philip N, Pierpont ME, Procaccio V, Roseli ZS, Rossi M, Rusu C, Sznajer Y, Templin L, Uliana V, Klaus M, Van Bon B, Van Ravenswaaij C, Wainer B, Fry AE, Rump A, Hoischen A, Drunat S, Rivière JB, Dobyns WB, Pilz DT. Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome: delineation of the spectrum in 42 cases. Eur J Hum Genet. 2015 Mar;23(3):292-301.

Wooderchak-Donahue WL, Johnson P, McDonald J, Blei F, Berenstein A, Sorscher M, Mayer J, Scheuerle AE, Lewis T, Grimmer JF, Richter GT, Steeves MA, Lin AE, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P. Expanding the clinical and molecular findings in RASA1 capillary malformation-arteriovenous malformation. Eur J Hum Genet. 2018 Oct;26(10):1521-1536.

Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. Nat Rev Genet. 2018 May;19(5):253-268.

Yamamoto GL, Aguena M, Gos M, Hung C, Pilch J, Fahiminiya S, Abramowicz A, Cristian I, Buscarilli M, Naslavsky MS, Malaquias AC, Zatz M, Bodamer O, Majewski J, Jorge AA, Pereira AC, Kim CA, Passos-Bueno MR, Bertola DR. Rare variants in SOS2 and LZTR1 are associated with Noonan syndrome. J Med Genet. 2015 Jun;52(6):413-21.

Yang QL, Bian YY, Wang B, Zuo L, Zhou MY, Shao H, Zhang YM, Liu LW. Novel phenotype-genotype correlations of hypertrophic cardiomyopathy caused by mutation in α-actin and myosin-binding protein genes in three unrelated Chinese families. J Cardiol. 2019 May;73(5):438-444.

Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hokosaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mima A, Lapunzina P, Santos-Simarro F, García-Miñaúr S, Ogata T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S, Matsubara Y, Kure S, Aoki Y. Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. Hum Genet. 2016 Feb;135(2):209-22.

Zenker M, Buheitel G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W, Tietze HU, Doerr HG, Hofbeck M, Singer H, Reis A, Rauch A. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. J Pediatr. 2004 Mar;144(3):368-74.

Zenker M, Horn D, Wieczorek D, Allanson J, Pauli S, van der Burgt I, Doerr HG, Gaspar H, Hofbeck M, Gillessen-Kaesbach G, Koch A, Meinecke P, Mundlos S, Nowka A, Rauch A, Reif S, von Schnakenburg C, Seidel H, Wehner LE, Zweier C, Bauhuber S, Matejas V, Kratz CP, Thomas C, Kutsche K. SOS1 is the second most common Noonan gene but plays no major role in cardio-facio- cutaneous syndrome. J Med Genet. 2007 Oct;44(10):651-6.

Zenker M, Lehmann K, Schulz AL, Barth H, Hansmann D, Koenig R, Korinthenberg R, Kreiss-Nachtsheim M, Meinecke P, Morlot S, Mundlos S, Quante AS, Raskin S, Schnabel D, Wehner LE, Kratz CP, Horn D, Kutsche K. Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations. J Med Genet. 2007 Feb;44(2):131-5.