Alexsandra Christianne Malaquias de Moura Ribeiro

**Avaliação do padrão de crescimento na síndrome de
Noonan em pacientes com mutações identificadas
nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção de
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de
Lima Jorge

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Alexsandra Christianne Malaquias de Moura

Avaliação do padrão de crescimento na síndrome de Noonan em pacientes com mutações identificadas nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS* / Alexsandra Christianne Malaquias de Moura Ribeiro. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Síndrome de Noonan/diagnóstico 2. Síndrome de Noonan/genética 3. Síndrome de Noonan/etiologia 4.Crescimento/genética 5.Transtornos do crescimento/genética 6.Somatomedinas/análise 7.Fator de crescimento insulín-like I/análise 8.Hormônio do crescimento/análise 9.MAP quinase quinase quinases/genética 10.Proteínas son of sevenless/genética 11.Gráficos de crescimento

USP/FM/DBD-123/11

Este trabalho foi realizado na Unidade Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM 42) da disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Auxílio à pesquisa 08/50184-2 e bolsa de doutorado individual 07/59555-0.

*O problema não é inventar. É ser
inventado hora após hora e nunca ficar
pronta nossa edição convincente.*

Carlos Drummond de Andrade

.

Dedicatória

Dedico esta tese à minha família:

Ao meu marido, Renato, pelo seu Amor. Esse sentimento que nos une
continua sendo a base de todas as minhas conquistas, pessoais e
profissionais.

Ao nosso filho, João Pedro, razão de todo nosso orgulho, que dividiu com
essa tese muito da minha atenção e dedicação.

À minha mãe, Annita, que esteve presente em todos os momentos desta
caminhada e que me ensinou que em todas as nossas escolhas é preciso ter
Fé.

Aos meus sogros, Rubens e Maria Valeriana, que sempre me acolheram
com carinho e amor de pais.

Agradecimientos

Agradeço inicialmente ao Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Endocrinologia, pela oportunidade de realizar essa tese.

Agradeço às minhas “irmãs” de orientação: Débora Coutinho, Luciana Montenegro e Everlayny Costalonga, as mais velhas, que me ensinaram muito sobre Biologia Molecular e como sobreviver aos percalços da bancada. À Patrícia Pugliese, cuja praticidade é meu “sonho de consumo”. À Andrea Leal cujo sorriso e carinho iluminam qualquer manhã mais difícil. Às minhas irmãs caçulas Adriana Braz e Renata Scalco que dividem comigo os bons e maus momentos das manhãs de ambulatório. Às minhas novas irmãs, Ana Canton, Andria Lido e Gabriela Vasques, por me ceder, gentilmente, as atenções do nosso orientador na reta final do doutorado.

Agradeço muito à Fernanda Corrêa e Aline Otto, minhas “irmãs adotivas”, pela amizade e incentivo constantes e, em especial à amiga Marcela França, cujos conselhos e apoio tornaram essa caminhada muito mais tranquila. Seu brilhantismo é um incentivo a todas nós.

Agradeço a Bruno Ferraz que, mesmo de longe, sempre é atencioso com nossas necessidades. Agradeço a todos os colegas pós-graduandos do LIM42 e do LIM25 que, de alguma forma, participaram na minha formação durante o doutorado. É sempre incrível perceber que o nosso ambiente de trabalho é regido pelo respeito e apoio sincero.

Esse respeito pelo outro com certeza é fruto do exemplo da Dra. Berenice B. Mendonça, cujo papel na formação de todos nós é inestimável.

Uma Professora que nos oferece diariamente a oportunidade de aprender não só sobre a Medicina, mas sobre a vida. Agradeço muito a confiança e o incentivo.

Agradeço ao Dr. Ivo Arnhold, que é um exemplo de dedicação, generosidade e humildade, com quem aprendi muito sobre crescimento e sobre Endocrinologia Pediátrica. Agradeço à Dra. Ana Claudia Latrônico por um ensinamento extraordinário: acreditar no seu trabalho, lutar pelos seus dados. E isso, não tem preço!

Agradeço a todos os outros professores e assistentes do LIM42, em especial Vinícius Nahime, Regina Matsunaga e Luciani Carvalho pelos bons conselhos de sempre.

A todos os funcionários do LIM42 e do LIM25, em especial à Mirian Nishi, Mariana Funari, Cristina Rossi, Maria Aparecida Medeiros e Maria das Graças Cavalcanti por toda ajuda no passo-a-passo da realização dessa tese. Gostaria de fazer uma menção honrosa a Nilda Oliveira por sua dedicação a todos os pós-graduandos, sem distinção.

Agradeço também aos colegas do ICr e InCor: à Dra. Débora Romeo Bertola pelos ensinamentos da síndrome de Noonan, por ter compartilhado dados e encaminhado pacientes; ao Dr. Alexandre Pereira pela ajuda em relação às cardiopatias e Biologia Molecular; e às biólogas Amanda Salem Brasil e Luciana Turolla, com quem tive o prazer de trabalhar nesse período e dividir minhas angústias.

Não posso me furtar em agradecer a quem colaborou para a minha formação como Endocrinologista Pediátrica: os docentes e médicos

contratados da Endocrinologia, Clínica e Pediátrica, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. A eles devo todo o meu amor pela Endocrinologia, em especial ao Dr. Ayrton Moreira, Dra. Margaret Castro e Dra. Lucila Elias.

Ao meu amigo Sonir Antonini, meu agradecimento mais do que especial! Graças ao seu precioso conselho, optei pelo doutorado no grupo da Endocrinologia do Crescimento e Desenvolvimento e por ser aluna do Prof. Dr. Alexander Jorge. Agradeço seu carinho, sua paciência, apoio, incentivo e, sobretudo, sua confiança em mim. É uma sorte ter a oportunidade de compartilhar sua amizade.

É preciso ter muita fé em Deus ou sorte, talvez, para escolher um orientador. Tive a oportunidade de ter dois orientadores especiais: no meu Mestrado, o Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Jr., que foi fundamental para a minha formação profissional e pessoal e por quem nutro um carinho e amor de filha. E no meu doutorado, o Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge. O Alex é um orientador excepcional, presente e dedicado. Mas, além disso, é um amigo para todas as horas. Ele foi fundamental para consolidar meus conhecimentos em Endocrinologia Pediátrica e para que eu progredisse num campo até então desconhecido e antipatizado, a Biologia Molecular. Também tive a oportunidade de trilhar outros caminhos na Genética Clínica. Com o término desta tese, observo o quanto um orientador pode influenciar um aluno e, no meu caso, tenho certeza que meu crescimento profissional foi inquestionável. Cada aluno merece o orientador que tem!

O momento de conclusão de uma tese traz sempre a alegria da realização. E é nesse momento de agradecimento que refletimos sobre o que consideramos mais importante nessa conquista. Não tenho dúvidas de que a minha maior conquista durante esses três anos foram os amigos que fiz.

Mais uma vez, agradeço a Deus todas as oportunidades que me foram dadas na vida e todas as minhas escolhas.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Lista de Apêndices

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Diagnóstico da SN	6
1.1.1	Diagnóstico Clínico.....	6
1.1.2	Diagnóstico molecular da SN	9
1.2	Genes determinantes da SN.....	11
1.2.1	<i>PTPN11</i>	11
1.2.2	<i>RAS</i>	14
1.2.3	<i>SOS1</i>	17
1.2.4	<i>RAF1</i>	19
1.3	Correlação genótipo-fenótipo.....	22
1.4	SN e crescimento linear	23
2	OBJETIVOS.....	26
3	MÉTODOS.....	28
3.1	Considerações éticas.....	29
3.2	Casuística	29
3.2.1	Pacientes.....	29
3.3	Avaliação hormonal.....	30
3.4	Estudo Molecular	31
3.4.1	Preparação das amostras do DNA genômico de leucócitos periféricos	33
3.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	34
3.4.3	Sequenciamento Automático.....	35
3.5	Análises estatísticas.....	36
3.5.1	Construção da curva de referência para síndrome de Noonan	36
3.5.2	Comparação entre grupos	37

4	RESULTADOS.....	39
4.1	Caracterização das mutações encontradas	40
4.1.1	<i>PTPN11</i>	41
4.1.2	<i>KRAS</i>	43
4.1.3	<i>RAF1</i>	44
4.1.4	<i>SOS1</i>	45
4.2	Análise do padrão de crescimento linear nos pacientes com mutação nos genes <i>PTPN11</i> , <i>SOS1</i> , <i>RAF1</i> e <i>KRAS</i>	46
4.2.1	Análise do comprimento e peso ao nascimento	46
4.2.2	Construção da curva de referência.....	46
4.2.3	Análise da correlação genótipo-fenótipo.....	49
4.2.3.1	Comparação entre os pacientes com mutações nos genes relacionados e os pacientes sem mutações identificadas.....	49
4.2.3.2	Análise do crescimento dos pacientes com mutação nos genes <i>PTPN11</i> , <i>SOS1</i> , <i>RAF1</i> e <i>KRAS</i>	50
4.2.3.3	Correlação genótipo-fenótipo em relação ao tipo de mutação do <i>PTPN11</i>	54
4.2.3.4	Análise da influência dos polimorfismos do gene <i>KRAS</i> sobre o fenótipo dos pacientes com mutação no gene <i>PTPN11</i>	55
4.2.3.5	Análise do fenótipo das mutações mais frequentemente encontradas nos genes <i>PTPN11</i> e <i>RAF1</i>	56
4.2.4	Análise do eixo GH / IGF-1	58
4.2.4.1	Análise das concentrações de GH após estímulo farmacológico.....	58
4.2.4.2	Análise das concentrações basais de IGF-1 e IGFBP-3 nos pacientes com SN com e sem mutação nos genes estudados	58
5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÕES.....	70
7	ANEXOS	73
8	REFERÊNCIAS	86

Apêndices

Lista de abreviaturas

BRAF	<i>V-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CFC	Síndrome Córdio-fácio-cutânea
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNPM	desenvolvimento neuropsicomotor
ERK	quinases extracelulares sinalizadoras
EVP	Estenose de valava pulmonar
F	feminino
GH	hormônio de crescimento
IGF-1	fator de crescimento insulina-símile 1
IGFBP-3	Proteína ligadora de IGF-3
IMC	índice de massa corporal
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LS	síndrome de LEOPARD
M	masculino
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI3K	fosfatidilinositol 3 quinase
PTPN11	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i>
pY	tirosina fosforilada
RAF1	<i>murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
SC	Síndrome de Costello
SHOC2	<i>Suppressor of clear, C. Elegans, homolog of</i>

SHP-2	<i>Src homology region 2-domain phosphatase 2</i>
SN	Síndrome de Noonan
SOS1	<i>son of sevenless, drosophila, homolog 1</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> enzima polimerase

Lista de figuras

Figura 1: Via de sinalização RAS/MAPK.....	10
Figura 2: Representação esquemática do gene <i>PTPN11</i> e dos domínios da proteína SHP-2, codificada por esse gene.....	12
Figura 3: Representação do mecanismo de ativação da SHP-2.....	13
Figura 4: Representação esquemática do ciclo do RAS	16
Figura 5: Estrutura e regulação da proteína SOS	19
Figura 6: Modelo de ativação da RAF1.....	21
Figura 7: Fluxograma da estratégia de estudo.....	32
Figura 8: Comparação do Z-altura entre os genótipos.....	53
Figura 9: Comparação do Z-IMC entre os genótipos	53

Lista de tabelas

Tabela 1:	Anormalidades fenotípicas associadas à SN.....	4
Tabela 2:	Genes causadores e principais características clínicas da SN e doenças relacionadas	5
Tabela 3:	CrITÉRIOS diagnÓsticos para SN (5)	8
Tabela 4:	Características clínicas dos pacientes com síndrome de Noonan selecionados para o estudo.....	30
Tabela 5:	Frequência das mutações nos genes <i>PTPN11</i> , <i>SOS1</i> , <i>RAF1</i> e <i>KRAS</i> nos 152 pacientes estudados.....	40
Tabela 6:	Mutações identificadas no gene <i>PTPN11</i> nos pacientes com SN.....	42
Tabela 7:	Mutações identificadas no gene <i>KRAS</i> nos pacientes com SN	43
Tabela 8:	Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos do gene <i>KRAS</i> nos 65 pacientes avaliados com mutação no gene <i>PTPN11</i>	44
Tabela 9:	Mutações identificadas no gene <i>RAF1</i> nos pacientes com SN	44
Tabela 10:	Mutações identificadas no gene <i>SOS1</i> nos pacientes com SN.....	45
Tabela 11:	Dados longitudinais de crescimento dos pacientes com mutação nos genes <i>PTPN11</i> , <i>SOS1</i> , <i>RAF1</i> e <i>KRAS</i>	48
Tabela 12:	Características clínicas entre os pacientes com e sem mutação nos genes relacionados	50
Tabela 13:	Características clínicas dos pacientes com mutação nos genes <i>PTPN11</i> , <i>SOS1</i> , <i>RAF1</i> e <i>KRAS</i>	52
Tabela 14:	Características clínicas dos pacientes com mutação no <i>PTPN11</i> com maior ou menor atividade constitutiva tirosina fosfatase da SHP-2.....	55
Tabela 15:	Características clínicas dos 40 pacientes com mutação no <i>PTPN11</i> e polimorfismos no gene <i>KRAS</i>	56
Tabela 16:	Características clínicas dos pacientes carreadores das duas mutações mais frequentes na casuística de pacientes com SN: p.N308D do gene <i>PTPN11</i> e p.S257L do gene <i>RAF1</i>	57

Lista de anexos

Anexo A: Pares de <i>primers</i> dos genes estudados.....	74
Anexo B: Valores de percentil para altura e IMC em relação à idade no sexo masculino e feminino.....	76
Anexo C: Curvas de crescimento construídas para SN.....	80
Anexo D: Curvas de crescimento para SN construídas por Ranke <i>et. al.</i> ⁽¹⁵⁾ (verde) sobreposta à curva de crescimento construída para SN no presente estudo nos sexos masculino (azul) e feminino (rosa).....	84

Lista de Apêndice

Apêndice 1: Artigo do Hormone Research

Apêndice 2: Artigo do ABEM

Resumo

Ribeiro ACMM. *Avaliação do padrão de crescimento na síndrome de Noonan em pacientes com mutações identificadas nos genes PTPN11, SOS1, RAF1 e KRAS* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011: 97p.

A Síndrome de Noonan (SN) é caracterizada por baixa estatura proporcionada de início pós-natal, dismorfismos faciais, cardiopatia congênita e deformidade torácica. A frequência da SN é estimada entre 1:1000 e 1:2500 nascidos vivos, com distribuição semelhante em ambos os sexos. A herança é autossômica dominante com penetrância completa, porém a maioria dos casos é esporádica. Até o momento, mutações em genes da via RAS-MAPK (*PTPN11*, *KRAS*, *SOS1*, *RAF1*, *MEK1*, *NRAS* e *SHOC2*) foram identificadas em aproximadamente 70% dos pacientes. Uma das principais características fenotípicas da SN é a baixa estatura pós-natal, embora o mecanismo fisiopatológico do déficit de crescimento nesta síndrome ainda não esteja totalmente esclarecido. Estudos que avaliaram o padrão de crescimento linear em crianças com SN foram realizados anteriormente ao conhecimento do diagnóstico molecular dessa síndrome. No presente estudo, avaliamos a frequência de mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS* em 152 pacientes com SN e o padrão de crescimento linear (altura) e ponderal [índice de massa corpórea (IMC)] dos pacientes com mutação identificada. No total, mutações nos genes relacionados foram encontradas em 99 pacientes (65%) do nosso estudo, com predominância do gene *PTPN11* (47%), seguido do *SOS1* (9%), *RAF1* (7%) e *KRAS* (3%). Foram construídas curvas específicas para SN de Altura e IMC para idade e sexo utilizando o método LMS. Os pacientes com SN apresentaram crescimento pré-natal preservado, porém o comprometimento do crescimento pós-natal foi observado desde o primeiro ano de vida, atingindo uma altura final de -2,5 e -2,2 desvios-padrão da média para população brasileira em homens e mulheres, respectivamente. O prejuízo da altura foi maior nos pacientes com mutação no gene *RAF1* em comparação com os genes *PTPN11* e *SOS1*. O IMC dos pacientes com SN apresentou queda de 1 desvio-padrão em relação à média da população brasileira normal. O comprometimento do IMC foi menor nos pacientes carreadores de mutação no *RAF1*. Pacientes com mutação nos genes *PTPN11* e *SOS1* apresentaram maior frequência de estenose de valva pulmonar, enquanto a miocardiopatia hipertrófica foi mais frequente nos pacientes com mutação no gene *RAF1*. A variabilidade fenotípica observada nos pacientes com mutação no *PTPN11* não pode ser explicada pelo grau que estas mutações influenciam a atividade tirosina fosfatase da SHP-2 nem pela presença de polimorfismos no gene *KRAS*. Com a análise dos éxons 3, 8 e 13 do *PTPN11*, seguido dos éxons 6 e 10 do *SOS1* e éxon 7 do *RAF1*

identificamos 86% dos pacientes carreadores de mutações nos genes relacionados, propondo uma forma mais eficiente de avaliação molecular na SN. Acreditamos que a variabilidade fenotípica presente nessa síndrome esteja diretamente ligada aos diferentes papéis exercidos pelas proteínas que participam da via RAS/MAPK. Entretanto, mais estudos em relação à via RAS/MAPK serão necessários para esclarecer as questões relacionadas ao crescimento e outras características fenotípicas da SN.

Descritores: 1.Síndrome de Noonan/diagnóstico 2.Síndrome de Noonan/genética 3.Síndrome de Noonan/etiologia 4.Crescimento/genética 5.Transtornos do crescimento/genética 6.Somatomedinas/análise 7.Fator de crescimento insulin-like I/análise 8.Hormônio do crescimento/análise 9.MAP quinase quinase quinases/genética 10.Proteínas Son of sevenless/genética 11.Gráficos de crescimento

Summary

Ribeiro ACMM. *Growth pattern of patients with Noonan syndrome with identified mutations in PTPN11, SOS1, RAF1 e KRAS genes* [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2011: 97p.

Noonan Syndrome (NS) is characterized by distinctive facial features, short stature and congenital heart defects. The estimated prevalence is 1:1000 to 1:2500 live births, affecting equally both sexes. It is an autosomal dominant disorder with complete penetrance, but most cases are sporadic. To date, mutations in the RAS/MAPK pathway genes (*PTPN11*, *KRAS*, *SOS1*, *RAF1*, *MEK1*, *NRAS* and *SHOC2*) were identified in approximately 70% of patients. One of the cardinal signs of NS is proportional postnatal short stature although the physiopathological mechanism of growth impairment remains unclear. The current knowledge about the natural history of growth associated with NS was described before molecular diagnosis era. In this study, we performed *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, and *KRAS* mutation analysis in a cohort of 152 NS patients and studied the natural linear (height) and ponderal growth [body mass index (BMI)] of NS patients with related mutations. Mutations in NS-causative genes were found in 99 patients (65%) of our cohort. The most common mutated gene was *PTPN11* (47%), followed by *SOS1* (9%), *RAF1* (7%) and *KRAS* (3%). Sex-specific percentile curves for height and BMI were constructed using the LMS method. NS patients had birth weight and length within normal ranges but the postnatal growth impairment was observed during the first year of life, reaching a final height of -2.3 and -2.2 standard deviations from the mean for Brazilian healthy men and women, respectively. Postnatal growth impairment was higher in *RAF1* mutation patients than in patients with *SOS1* and *PTPN11* mutations. BMI values in NS patients were lower in comparison with normal Brazilian population. BMI values were higher in patients with *RAF1* mutations than in patients with other genotypes. Patients with mutations in *PTPN11* and *SOS1* genes were more likely to have pulmonary valve stenosis, whereas hypertrophic cardiomyopathy was more common in patients with mutations in the gene *RAF1*. The intensity of constitutive tyrosine phosphatase activity of SHP-2 due to *PTPN11* mutations, as well as the presence of polymorphisms in *KRAS* gene did not influence the phenotype of NS patients with mutation in *PTPN11* gene. Analysis of exons 3, 8 and 13 of *PTPN11* gene, followed by exons 6 and 10 of *SOS1* gene and exon 7 of *RAF1* gene identified 86% of patients harboring mutations in related genes, suggesting a more efficient evaluation of NS molecular diagnosis. We believe that the phenotypic variability in this syndrome is directly linked to the different roles played by proteins that participate in RAS/MAPK pathway. However, further studies in RAS/MAPK pathway are needed to clarify issues related to growth and other phenotypic characteristics of SN.

Descriptors: 1.Noonan syndrome 2.Growth 3.Growth disorders 4.Insulin-Like growth factor I 5.Mitogen-activated protein kinase 1 6.Growth hormone 7.Son of sevenless homolog 1 8.Body mass index 9.Growth charts.

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Noonan (SN; OMIM 163950) foi descrita pela primeira vez em 1963 ⁽¹⁾ e é caracterizada por baixa estatura proporcionada de início pós-natal, dismorfismos faciais, cardiopatia congênita (principalmente estenose valvar pulmonar, cardiomiopatia hipertrófica e defeitos septais), deformidade torácica (*pectus excavatum* e/ou *carinatum*), além de outras alterações menos frequentes (déficit visual ou auditivo, discreto retardo mental, hepatoesplenomegalia, distúrbios de coagulação e criptorquidia) (Tabela 1). A frequência da SN é estimada entre 1:1000 e 1:2500 nascidos vivos, com distribuição semelhante entre ambos os sexos ⁽²⁾. A herança é autossômica dominante com penetrância completa, porém a maioria dos casos é esporádica ⁽³⁾.

O fenótipo da SN é dinâmico e muda significativamente com a idade, tornando-se mais sutil e de difícil diagnóstico na idade adulta ⁽⁴⁾. Além disso, uma característica marcante da SN é a grande variabilidade fenotípica observada tanto entre indivíduos de uma mesma família ⁽⁵⁾ quanto entre aqueles com o mesmo defeito molecular ⁽⁶⁾.

Recentemente, mutações germinativas encontradas em componentes da via de sinalização RAS/MAPK (mitogen-activated protein kinase) foram descritas em pacientes com SN e em outras quatro síndromes raras cujo fenótipo se sobrepõe ao da SN: Síndrome de LEOPARD (Lentiginos múltiplos, anormalidades Eletrocardiográficas de condução, hipertelorismo

Ocular, estenose **P**ulmonar, **A**normalidades de genitália, **R**etardo de crescimento, surdez – **D**eafness; SL, OMIM 151100), Síndrome Córdio-fácio-cutânea (CFC, OMIM 115150), Síndrome de Costello (SC, OMIM 218040) e Neurofibromatose tipo 1 (NF1, OMIM 162200) ⁽⁷⁾ (Tabela 2).

Vários hormônios, incluindo o hormônio de crescimento (GH) e o fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF-1), agem através de receptores tirosina quinase para estimular a via de sinalização RAS/MAPK. Devido a isso, a SN e as outras doenças relacionadas representam uma importante oportunidade de estudar o envolvimento da via RAS/MAPK em vários sistemas endócrinos.

Tabela 1: Anormalidades fenotípicas associadas à SN. As frequências são mostradas entre parênteses ⁽⁸⁻¹⁰⁾

CARACTERÍSTICAS	SINAIS
HERANÇA	Autossômica dominante
CRESCIMENTO	Baixa estatura de início pós-natal (50-80%) <i>Failure to thrive</i> na infância (40%)
CABEÇA E PESCOÇO	Face triangular progressiva com a idade; Anormalidades do pavilhão auricular (44-90%): baixa implantação, má rotação e espessamento de hélice; Anormalidades oculares (95%): ptose, hipertelorismo, epicanto, fissuras palpebrais voltadas para baixo, estrabismo, proptose, miopia e nistagmo Filtro nasal alargado (95%) Palato ogival (45%-34%) Micrognatia (22%) Má oclusão dentária (35%) Baixa implantação de cabelos posteriormente (32%) Anormalidades cervicais (95%): <i>pterygium colli</i> , pescoço curto ou alado
CARDIOVASCULAR	Cardiopatias congênitas (50%-75%): estenose valvar pulmonar (50%), miocardiopatia hipertrófica (10%), defeito de septo atrial (10%) e outros (estenose aórtica, defeitos de septo ventricular e insuficiência mitral) Eletrocardiograma com desvio de eixo para esquerda e padrão negativo nas derivações precordiais à esquerda
TÓRAX	Anormalidades torácicas (53%-70%): <i>pectus carinatum</i> superiormente e/ou <i>pectus excavatum</i> inferiormente, tórax alargado e outras deformidades
GENITOURINÁRIO	Criptorquidia (60%-69%) Atraso puberal
ANORMALIDADES ESQUELÉTICAS	Anormalidades da coluna vertebral (25%) Cúbito valgo (47%) Anormalidades das mãos: clinodactilia/braquidactilia
NEUROLÓGICO	Atraso do desenvolvimento motor (26%), dificuldade de aprendizado (15%) e atraso de linguagem (20%) Retardo mental leve (25%-35%)
HEMATOLÓGICAS	Defeitos da coagulação (20%), incluindo deficiência de fator XI ou XII, doença de von Willebrand, disfunção plaquetária e leucemia (em especial leucemia mielomonocítica juvenil – JMML)
OUTROS	Linfedema periférico, esplenomegalia, surdez

Tabela 2: Genes causadores e principais características clínicas da SN e doenças relacionadas

Doença	Gene Causador	Comentários
Síndrome de Noonan (SN)	<i>PTPN11, KRAS, NRAS, SOS1, RAF1, BRAF, MEK1, SHOC2, CBL</i>	Ver tabela 1
Neurofibromatose tipo 1 (NF1)	<i>NF1</i>	História familiar de câncer. Características marcantes incluem lesões cutâneas hiperpigmentadas e neurofibromas benignos. Dificuldades de aprendizado.
Síndrome de LEOPARD (SL)	<i>PTPN11, RAF1, BRAF</i>	Lentíginos múltiplos, alterações eletrocardiográficas de condução, hipertelorismo ocular, estenose pulmonar, alterações de genitália, baixa estatura e surdez.
Síndrome de Costello (SC)	<i>HRAS</i>	Síndrome rara associada a retardo mental, peso de nascimento elevado seguido de dificuldade alimentar no período neonatal, cabelos encaracolados, facies grosseira, lábios volumosos, papiloma nasal, hiperpigmentação cutânea difusa e distrofia ungueal
Síndrome Córdio-fácio-cutânea (CFC)	<i>KRAS, BRAF, MEK1, MEK2</i>	Síndrome rara caracterizada por facies grosseira, cardiopatia congênita, anormalidades ectodérmicas (hiperqueratose folicular e palmar), baixa estatura, retardo mental, moderado a grave e características faciais típicas da SN e SC.

1.1 Diagnóstico da SN

1.1.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico da SN é baseado nos achados clínicos. No recém-nascido, o excesso de pele observado na região da nuca é decorrente da presença de higroma cístico no período pré-natal; as características faciais mais marcantes nessa faixa etária são hipertelorismo ocular, fissuras palpebrais desviadas para baixo, baixa implantação e rotação incompleta das orelhas com espessamento da hélice, ptose palpebral, filtro nasal alargado, palato arqueado, micrognatia e baixa implantação de cabelos. No decorrer da infância, a cabeça adquire um formato turricéfalo e os olhos tornam-se proeminentes; a base do nariz é alargada. A face assume progressivamente um formato mais triangular, tornando-se grosseira no final da infância; com marcada ptose palpebral. A medida que ocorre o alongamento do pescoço, o *pterygium colli* torna-se mais perceptível ^(8, 11).

Em torno de 3-4 anos, as deformidades torácicas tornam-se evidentes, com *pectus carinatum* superiormente e *pectus excavatum* inferiormente. O tórax é largo, lembrando o formato de uma pirâmide invertida com hipertelorismo mamário. Outras anormalidades esqueléticas incluem cúbito valgo, clinobraquidactilia, escoliose/cifose e má oclusão dentária. ^(8, 11).

Cardiopatias congênicas são observadas em 80-90% dos pacientes ⁽¹²⁾. As anomalias mais frequentes são estenose de valva pulmonar, defeito do

septo atrial, miocardiopatia hipertrófica e persistência do ducto arterial, embora estenose do ramo da artéria pulmonar, prolapso de valva mitral, anomalia de Ebstein e ventrículo único também já tenham sido relatadas ⁽⁸⁾. O eletrocardiograma mostra desvio de eixo para esquerda, ondas Q gigantes e um padrão negativo nas derivações precordiais à esquerda ⁽¹³⁾.

A baixa estatura de início pós-natal é uma das características clínicas mais frequentemente observadas na SN, afetando cerca de 50-70% os pacientes ⁽¹⁴⁾. Durante a infância observa-se crescimento paralelo à curva de referência ⁽¹⁵⁾, observando-se atraso na idade óssea em mais de 20% dos casos ⁽⁸⁾. A intensidade da baixa estatura não é explicada pela presença de defeitos cardíacos ou pela dificuldade alimentar observada nestes pacientes na infância ⁽¹⁶⁾.

Praticamente metade dos pacientes masculinos apresenta criptorquidia uni ou bilateral e a puberdade é atrasada em ambos os sexos. A fertilidade é preservada no sexo feminino, podendo ser comprometida no sexo masculino devido à criptorquidia ⁽¹¹⁾. Retardo mental é incomum, mas algum grau de dificuldade de aprendizado pode exigir acompanhamento especial. A hipotonia muscular muitas vezes colabora para o retardo no desenvolvimento motor. Alterações hematológicas incluem deficiência de fator XI, Doença de Von Willebrand, trombocitopenia, e defeitos na função plaquetária. Anormalidades linfáticas ocorrem em menos de 20% dos pacientes, mas podem estar associadas a complicações sérias ^(8, 11).

A grande variabilidade fenotípica justificou a tentativa de padronizar o diagnóstico desta síndrome. Em 1981, Duncan *et al.* propuseram um sistema

de escore para o diagnóstico da SN com base em 26 itens encontrados comumente nestes pacientes ⁽⁹⁾. A complexidade deste primeiro sistema de escore dificultou o seu uso rotineiro. Mais tarde, Sharland *et al.* recomendaram que o diagnóstico fosse baseado na presença de características faciais típicas associadas à baixa estatura (altura < 10º percentil para idade e sexo) e/ou defeito cardíaco e/ou criptorquidia em um paciente com cariótipo normal ⁽¹⁷⁾. Porém, essa nova recomendação excluía aqueles indivíduos com fenótipo mais leve. Finalmente, em 1994, van der Burgt *et al.* sugeriram um sistema simples e eficiente com base na pontuação de critérios maiores e menores que considera a variabilidade clínica presente na SN ⁽⁵⁾ (Tabela 3).

Tabela 3: Critérios diagnósticos para SN (5)

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	A= MAIORES	B= MENORES
1. FACIAIS	Típica	Sugestiva
2. CARDÍACAS	Estenose valvar pulmonar e/ou ECG típico	Outro defeito cardíaco
3. ALTURA	< 3o percentil	< 10o percentil
4. TORÁCICAS	<i>Pectus carinatum</i> e/ou <i>excavatum</i>	Tórax alargado
5. HISTÓRIA FAMILIAR	Parente de 1o grau com diagnóstico definitivo	Parente de 1o grau com diagnóstico sugestivo
6. OUTROS: Retardo mental Displasia linfática Criptorquidia (♂)	Todas	Qualquer um das 3 características

Face típica: face triangular, fenda palpebral oblíqua, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, pavilhão auricular malformado e de implantação baixa, micrognatia, pescoço alado.

Diagnóstico Definitivo:

1A + um de 2A a 6A ou dois de 2B a 6B

1B + dois de 2A a 6A ou três de 2B a 6B

1.1.2 Diagnóstico molecular da SN

Estudos de associação realizados em famílias afetadas relacionaram o fenótipo de SN à região 12q22-qter^(18, 19). Em 2001, Tartaglia *et al.* identificaram mutações *missense* no gene *PTPN11* (protein tyrosinephosphatase non-receptor 11) em uma coorte de pacientes com SN familiar e esporádico em uma frequência de 45% dos casos⁽²⁰⁾. O gene *PTPN11* foi considerado gene candidato por estar localizado na região referida e porque seu produto, a proteína SHP-2, apresenta um papel crítico em várias vias de sinalização celular, controlando diversos processos do desenvolvimento, incluindo a formação da valva semi-lunar cardíaca. Trabalhos subsequentes identificaram mutações numa frequência que varia de 29% a 60%^(3, 6, 21-23).

Estudos funcionais das mutações no gene *PTPN11* mostraram aumento da atividade tirosino-fosfatase da proteína SHP-2 e aumento da transdução do sinal via RAS/MAPK. Visando identificar outros genes causadores da SN em pacientes sem mutações no *PTPN11*, foram estudados diversos genes que também codificam proteínas envolvidas na sinalização RAS/MAPK (Figura 1). Com esta estratégia, novos genes envolvidos na patogênese da SN foram identificados: *KRAS*⁽²⁴⁾, *SOS1*⁽²⁵⁻²⁷⁾, *RAF1*^(28, 29), *MEK1*⁽³⁰⁾, *BRAF*⁽³¹⁾, *NRAS*⁽³²⁾, *SHOC-2*⁽³³⁾ e *CBL*⁽³⁴⁾.

Figura 1: Via de sinalização RAS/MAPK: Resíduos de tirosina fosforilada de receptores de tirosina-quinase agem como sítios de ligação para moléculas intracelulares que contêm um domínio SH-2, como SHC, SHP-2 e GRB2. Essas moléculas recrutam a proteína SOS1, que promove a ativação da proteína RAS facilitando a troca de um GDP (inativo) por um GTP (ativo). RAS-GTP ativa diretamente a via MAPK (RAF-MEK-ERK). ERK quinase pode fosforilar substratos citosólicos e nucleares incluindo fatores de transcrição que regulam o ciclo celular. SHC: *signaling and transforming protein containing Src homology 2 and 3 (SH2 and SH3) domains*; SHP-2: *Src Homology region 2-domain Phosphatase 2*; GRB2: *growth factor receptor-bound protein 2*; SOS 1: *son of sevenless 1*; NF1: *neurofibromin*; RAS: *rat sarcoma viral oncogene homolog*; RAF: *murine sarcoma viral oncogene homolog*; MEK: *mitogen-activated kinase kinase*; ERK: *mitogen-activated kinase*

1.2 Genes determinantes da SN

1.2.1 *PTPN11*

O gene *PTPN11* localiza-se no braço longo do cromossomo 12 (12q2.4), possui 2768 pb de extensão, sendo 1779 pb responsáveis por sua região codificadora constituída por 15 éxons que codificam a proteína tirosina-fosfatase SHP-2 (*Src Homology region 2-domain Phosphatase 2*) (Figura 2). A SHP-2 pertence a uma subfamília de proteínas tirosina-fosfatases não-transmembrana caracterizadas por conter 2 domínios SH2 (***Src-homology 2***, onde Src significa ***Santonin-related complex***) na porção amino-terminal e um domínio catalítico PTP na porção carboxi-terminal. A SHP-2 é uma proteína expressa universalmente em todos os tecidos de vertebrados ⁽³⁵⁾.

Os domínios SH2, N-SH2 e C-SH2, são responsáveis pelo reconhecimento e ligação da SHP-2 a sítios de tirosina fosforilada de receptores ou de proteínas adaptadoras que contenham a sequência de reconhecimento. Através do domínio catalítico (PTP), a SHP-2 exerce sua capacidade de desfosforilar sítios de tirosina fosforilada ⁽³⁶⁾.

Além dos domínios SH2 e PTP, a SHP-2 também possui uma cauda carboxi-terminal ("*C-tail*") na qual estão localizados dois resíduos de tirosina (Y546 e Y584) que são fosforilados por proteínas tirosina-quinases. Através desses sítios, a SHP-2 também pode funcionar como molécula adaptadora e amplificadora do sinal de alguns receptores ^(37, 38). Ambas as funções,

molécula adaptadora e tirosina-fosfatase, são relevantes e podem ter efeito direto positivo ou negativo nas cascatas de sinalização ⁽³⁹⁾.

Figura 2: Representação esquemática do gene *PTPN11* e dos domínios da proteína SHP-2, codificada por esse gene. O éxon 1 codifica a região 3' não-traduzida, os éxons 2 e 3, o domínio SH-2 amino-terminal (N-SH2), os éxons 4 e 5, o domínio SH-2 carboxi-terminal (C-SH2), os éxons de 6 a 13, o domínio tirosinofosfatase (PTP) e os éxons 14 e 15 codificam a região carboxi-terminal. ATG: início da região codificadora. yy: representação de sítios de tirosina fosforilada

Os domínios SH2 (particularmente o N-SH2) regulam a atividade do domínio PTP. No estado inativo da SHP-2, o domínio N-SH2 tem ligação intramolecular com o domínio PTP, exercendo bloqueio sobre esse sítio. Os sítios de ligação às tirosinas fosforiladas de ambos os domínios SH2 estão totalmente expostos na superfície da molécula, do lado oposto ao da ligação com o domínio PTP. Quando a SHP-2 liga-se a uma tirosina fosforilada através dos seus domínios SH2 ocorre uma mudança conformacional da sua estrutura, que desfaz a interação entre os domínios N-SH2 e PTP, acarretando um aumento da sua atividade tirosina fosfatase. Os domínios

SH2 têm função principalmente regulatória, e sua remoção resulta em aumento da atividade tirosina fosfatase de 12 a 45 vezes ⁽⁴⁰⁾ (Figura 3).

Figura 3: Representação do mecanismo de ativação da SHP-2. No estado basal, a interação entre os domínios N-SH2/PTP mantém a SHP-2 na conformação inativa. Quando uma tirosina fosforilada liga-se a SHP-2 através de seus domínios SH2, ocorre uma mudança conformacional da sua estrutura, desfazendo a interação entre os domínios N-SH2/PTP e permitindo a exposição do sítio ativo da enzima, ao qual irá se ligar o substrato (S). (Adaptado de ⁽⁴¹⁾)

As mutações descritas na SN diminuem a interação entre os domínios N-SH2 e PTP e estabilizam a SHP-2 na sua conformação ativa. A maioria dos resíduos mutados na SN estão diretamente envolvidos na interação dos domínios N-SH2 e PTP (Asn58, Gly60, Asp61, Tyr62, Tyr63, Glu69, PHe71, Ala72, Thr73, Glu 76, Gln79, Gln256 e Tyr279) ou especialmente perto dessa interação (Thr2, Tyr279, Ile282, Phe285, Arg501, Ser502, Gly503 e Met504). A distribuição dos defeitos moleculares sugere que o mecanismo patogênico da SN envolve alteração dessa interação N-SH2/PTP que desestabiliza a conformação inativa sem alterar a capacidade catalítica da proteína SHP-2 ⁽⁴²⁾. Dessa forma, as mutações no *PTPN11* na SN seriam de

ganho de função da proteína SHP-2⁽⁴³⁾ e aumentariam a transdução do sinal intracelular pela via RAS/MAPK⁽⁴⁴⁾.

Os éxons 3, 7, 8 e 13 foram considerados regiões *hot spot* por concentrarem 86,7% das mutações descritas. A troca de A>G no nucleotídeo 922, no éxon 8, causando uma substituição do aminoácido asparagina por ácido aspártico na posição 308 (p.Asn308Asp ou p.N308D) é a mutação mais comumente descrita, sendo encontrada em 25% dos pacientes com mutação no *PTPN11*. As mutações Asp61Gly, Tyr63Cys, Thr73Ile e Gln79Arg, no éxon 3, também foram as mais prevalentes⁽⁴²⁾.

1.2.2 RAS

Os genes da família *RAS* (*rat sarcoma*) foram primeiramente descritos como oncogenes do *Harvey (HRAS)* e *Kirsten (KRAS) sarcoma virus*⁽⁴⁵⁾. Os três genes humanos da família RAS, *KRAS* (isoformas A e B), *NRAS* e *HRAS* (isoformas 1 e 2), codificam proteínas de baixo peso molecular associadas a nucleotídeos guanínicos, as GTPases, importantes na transdução do sinal intracelular estimulado por diversos tipos de receptores. As proteínas HRAS, NRAS e KRAS possuem grande homologia em sua porção amino-terminal (resíduos 1-165) onde está localizado um domínio G altamente conservado. A porção carboxi-terminal abriga uma região hipervariável que consiste dos 25 aminoácidos finais dessa região. Nessa região ocorrem mudanças pós-translacionais que permitem a

ancoragem de cada uma das proteínas à membrana plasmática, etapa importante para transdução do sinal ⁽⁴⁶⁾.

As proteínas da família RAS agem ciclando entre um estado ativo ligado a uma guanosina trifosfato (RAS-GTP) e um estado inativo guanosina difosfato (RAS-GDP). Quando ocorre a ativação de receptores tirosina-quinase, diversas proteínas adaptadoras são recrutadas e ativam proteínas facilitadoras da troca do nucleotídeo guanina (GNEF; guanosina nucleotide exchange factor), as quais removem o nucleotídeo guanina do RAS permitindo a ligação passiva do GTP, que se encontra numa concentração citoplasmática 10 vezes maior que o GDP. No seu estado ativo, as duas regiões de troca do RAS (*switch region* I e II) mudam sua conformação, o que permite a ligação do RAS com suas proteínas efetoras, como o RAF e PI3K (*fosfatidil-inositol 3 quinase*), que regulam várias respostas celulares, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação celular ⁽⁴⁷⁾ (Figura 4).

A interrupção do sinal ocorre através da atividade GTPase intrínseca do RAS, resultando na hidrólise e liberação do grupo fosfato do RAS-GTP para produzir RAS-GDP ^(7, 47). A atividade GTPase intrínseca do RAS é baixa e pode ser incrementada em torno de 10^5 vezes através de proteínas que aumentam a atividade GTPase (Gap; **G**TPase **a**ctivating **p**rotein), como o *neurofibromin* (produto do gene *NF1*) ou p120 GAP (produto do gene *RASA1*) ⁽⁴⁷⁾. Mutações somáticas do gene *RAS* são encontradas em aproximadamente 30% dos casos de câncer em humanos. Mutações *hotspot* são observadas nos aminoácidos G12, G13 e Q61. Mutações nesses resíduos impedem a hidrólise intrínseca do RAS-GTP, assim

como sua resposta à ação dos Gap, resultando em um RAS-GTP constitutivamente ativo e, conseqüentemente, aumento da transdução do sinal via RAS/MAPK ⁽⁴⁸⁾.

Figura 4: Representação esquemática do ciclo do RAS. Em seu estado ativo, as duas regiões *switch I* e *II* do RAS mudam sua conformação, permitindo que o RAS ative proteínas efetoras. A atividade GTPase intrínseca do RAS hidrolisa um grupo fosfato para originar o RAS-GDP. Esta reação é acelerada pelos Gaps. Adaptado de ⁽⁴⁷⁾

O gene do *KRAS* localiza-se no cromossomo 12 (12p12.1) e possui 6 éxons. O *splicing* alternativo da região C-terminal resulta em duas isoformas: a isoforma *KRAS4a* que inclui o éxon 5 e contém um *stop* códon e a isoforma *KRAS4b* que inclui o éxon 6. Esta última é a isoforma predominante em todos os tecidos do organismo ^(49, 50) e a partir de agora

será referida somente como KRAS. Schubbert *et al.* descreveram a primeira mutação germinativa no *KRAS* (p.T58I) em uma lactente de 3 meses de vida com fenótipo grave de SN associado a JMML (leucemia mielomonocítica juvenil) ⁽²⁴⁾. Ampliando a casuística, o mesmo grupo descreveu mais 2 mutações (p.V14I e p.D153V) em 4 pacientes com SN, previamente excluídos para mutação no gene *PTPN11*, resultando numa frequência de 2,8%.

Até o momento, as mutações descritas concentram-se nos éxons 2, 3 e 6 e mantêm o KRAS na conformação ativa. Todas as mutações descritas são mutações *de novo*, com a atividade tirosina-quinase menor que a observada nas mutações somáticas. A frequência de mutações no *KRAS* em pacientes com SN sem mutação do *PTPN11* foi de 2-4% ⁽⁵⁰⁾. Mutações no *KRAS* também foram descritas na Síndrome CFC ^(24, 51).

1.2.3 *SOS1*

O gene *SOS1* (*son of sevenless homolog 1*) localiza-se no cromossomo 2 (2p22-p21), é composto por 23 éxons e codifica uma proteína facilitadora da troca do nucleotídeo guanina (*guanine nucleotide factor exchange* - GNEF) importante para a conversão do RAS-GDP em RAS-GTP. A estrutura da proteína SOS compreende 3 segmentos funcionais: o segmento catalítico, que contém o domínio Cdc25 e o domínio REM (*RAS Exchange Motif*); o segmento regulatório N-terminal, composto por duas *histone-like folds* seguidas pelos domínios DH (*Dbl-homology*) e PH

(*pleckstrin-homology*); e o segmento C-terminal, rico em prolina, que contém um sítio de ligação para proteínas adaptadoras portadoras do domínio SH3, como o Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*)⁽⁵²⁾ (Figura 5).

O mecanismo de ativação da SOS1 ainda não está totalmente esclarecido, entretanto, é sabido que a ativação da proteína SOS1 só ocorre após a ligação do RAS-GTP ao seu sítio alostérico e essa ativação é potencializada quando ambas as proteínas estão localizadas na membrana plasmática⁽⁵²⁾. A ligação entre um resíduo de ácido aspártico (Asp140) dentro do domínio *histone-like* com a Arg522 na hélice de ligação que conecta os domínios DH-PH ao domínio REM é responsável pelo bloqueio do sítio alostérico da SOS, mantendo uma conformação auto-inibitória da proteína. Nessa conformação, o sítio alostérico da SOS está bloqueado para ligação do RAS. Consistente com esse modelo, mutações nos resíduos Asp140 e Arg522 suprimem completamente a ligação entre o domínio *histone-like* e os domínios DH-PH-REM *in vitro*, permitindo a ativação da SOS pela ligação do RAS-GTP ao sítio alostérico da proteína SOS⁽⁵³⁾.

Mutações do gene *SOS1* foram identificadas em 17 a 28% dos pacientes com SN sem mutações no *PTPN11*^(25, 26, 54). Todas as mutações associadas à SN são mutações *missense* e estão localizadas nos domínios DH-PH e REM (que contribuem para a auto-inibição da proteína) resultando em ganho de função desta proteína e, conseqüentemente, aumento da atividade do RAS-GTP e da sinalização via RAS/MAPK⁽⁵⁵⁾.

A

B

Figura 5: Estrutura e regulação da proteína SOS. A: H, domínio *histone-like*; DH, domínio *Dbl-homology*; PH, domínio *pleckstrin-homology*; REM, domínio *RAS Exchange Motif*; CDC25, domínio catalítico; PxxP, região c-terminal rica em prolina. B: No estado inativo, os domínios DH e PH impedem a ligação do RAS-GTP no sítio alostérico da proteína SOS. O domínio H também pode contribuir para a inibição através da interação com a hélice de ligação que conecta os domínios DH-PH ao domínio REM. Após a ligação do domínio PH à membrana plasmática e mobilização do domínio DH (e possivelmente do domínio H), o Ras-GTP liga-se ao sítio alostérico e promove a ativação da proteína SOS. Adaptado de ⁽⁵³⁾

1.2.4 RAF1

A família RAF é composta por 3 genes: *ARAF*, *BRAF* e *CRAF* (ou *RAF1*). O gene *RAF1* localiza-se no cromossomo 3 (3p25.2), é composto por 17 éxons que codificam uma proteína importante da cascata MAPK e

principal efetor do RAS-GTP. As proteínas RAF quinases possuem atividade serina/treonina quinase e são constituídas por 3 regiões conservadas: CR1 (éxons 2-5) e CR2 (éxon 7), localizadas na porção amino-terminal e que constituem um domínio regulatório negativo; e CR3 (éxons 10-17), que é um domínio quinase localizado na porção carboxi-terminal. A região CR1 possui 2 domínios de ligação, RBD (*Ras binding domain*) e CRD (cysteine rich domain) que permitem a interação da proteína com o RAS-GTP e posterior recrutamento para a membrana plasmática ⁽⁵⁶⁾.

A conformação inativa, auto-inibitória, da proteína RAF1 é mantida pela associação com uma proteína adaptadora da família 14-3-3, que se liga a sítios específicos de serina fosforilados da proteína RAF1: S259 na região CR2 e S621 na região CR3. Especula-se que a 14-3-3 atua como uma ponte ligando o domínio regulatório ao domínio quinase, impedindo a RAF1 de adotar sua conformação ativa. Dessa forma, uma etapa chave na ativação da RAF1 é a dissociação da 14-3-3 da região CR2 através da desfosforilação da S259 pelas PP1C (protein phosphatase 1C) e/ou PP2A (protein phosphatase 2A), por exemplo, resultando na conformação ativa da RAF1. Além da dissociação do 14-3-3, a fosforilação de alguns resíduos, como S338 e T341, também é fundamental para a completa ativação da RAF1 e exposição do sítio de ligação a MEK1 (MAP2K1) ⁽⁵⁷⁾ (Figura 6).

Figura 6: Modelo de ativação da RAF1. **A:** No estado inativo, RAF1 é fosforilada no resíduo S259 e S621 e liga-se a proteína 14-3-3. **B:** Após estímulo com fatores de crescimento, a RAS-GTP acoplado a membrana plasmática liga-se ao domínio CR1, o que desloca a proteína 14-3-3, permitindo a desfosforilação da S259 pelas PP1 e/ou PP2. Posteriormente, ocorre a fosforilação dos resíduos S338, Y341, T491 e S494, importante para a completa ativação da proteína. Adaptado de ⁽⁵⁸⁾

Mutações do *RAF1* foram identificadas em 8% dos pacientes com SN sem mutações no *PTPN11* ⁽²⁸⁾ e estão agrupadas em 3 regiões da proteína. O primeiro agrupamento envolve a região N-terminal, na sequência consenso de ligação da proteína 14-3-3 (Arg256-Ser257-Thr258-Ser259-Thr260-Pro261) ou adjacente a esta, no domínio CR2 (éxon 7). Mutações

dentro dessa região são responsáveis por aproximadamente 70% de todos os defeitos do *RAF1*. O segundo agrupamento, afeta resíduos localizados no segmento de ativação do domínio quinase (ASP486 e Thr 491, éxon 14). O terceiro grupo afeta 2 resíduos adjacentes (Ser612 e Leu613, éxon 17), localizados na porção C-terminal em proximidade com a Ser621 ⁽⁵⁹⁾. As mutações localizadas no domínio CR2 impedem a fosforilação da S259 abolindo a ligação a proteína 14-3-3 e resultando em ganho de função da proteína *RAF1*, com ativação parcial da ERK ⁽⁵⁸⁾. Mutações no domínio CR3 da proteína também favorecem o ganho de função da proteína *RAF1*, porém através de um mecanismo ainda a ser esclarecido ⁽²⁸⁾.

1.3 Correlação genótipo-fenótipo

Classicamente, pacientes com mutação nos genes *PTPN11*, *KRAS*, *SOS1* e *RAF1* apresentam características faciais semelhantes. Entretanto, algumas características fenotípicas diferem em relação aos genes relacionados com a SN. Cílios e sobrancelhas esparsas, cabelos finos e encaracolados e alterações de pele, como eritema, chamam atenção para presença de mutações no gene *SOS1*. Assimetrias faciais e cranianas são mais comuns em mutações no *RAF1* enquanto que face grosseira ou uma raiz nasal proeminente e alargada é sugestiva de alterações no *KRAS*. O gene *PTPN11* é relacionado a um fenótipo mais típico, embora a face atípica possa ser encontrada em alguns indivíduos ⁽⁶⁰⁾.

Pacientes com mutação no gene *PTPN11* apresentam maior frequência de estenose de valva pulmonar, baixa estatura, deformidade torácica e deficiência do fator VIII da coagulação. Pacientes afetados por mutações no gene *SOS1* apresentam alterações ectodérmicas na maioria dos casos e estenose de valva pulmonar enquanto baixa estatura e retardo mental são menos comuns. A miocardiopatia hipertrófica e defeitos septais são observados com maior frequência nos pacientes com mutação no gene *RAF1*. Mutações no gene *KRAS* causam com maior frequência retardo mental e um fenótipo semelhante à CFC ou SC. Baixa estatura, pescoço alado, deformidade torácica também são características comuns nos pacientes com mutações no *KRAS* ⁽⁶⁰⁾.

1.4 SN e crescimento linear

Uma das principais características fenotípicas da SN é a baixa estatura pós-natal ⁽⁹⁾, embora o mecanismo fisiopatológico do déficit de crescimento nesta síndrome ainda não tenha sido totalmente esclarecido. Ao nascimento, o peso e o comprimento geralmente estão normais ⁽⁸⁻¹⁰⁾. Entretanto, durante a infância, é observado comprometimento progressivo da estatura, desde o primeiro ano de vida, que é independente de fatores nutricionais ⁽¹⁵⁾, resultando em baixa estatura em aproximadamente 80% dos pacientes com SN.

As primeiras descrições do padrão de crescimento da SN em um momento anterior ao estudo molecular dessa síndrome. Witt *et al* avaliaram 112 pacientes (64M:48F), de forma transversal, do nascimento até 60 anos de idade e obteve 1,5 observações/ano por paciente, totalizando 173 medidas. A altura final atingida aos 18 anos foi 161 centímetros (cm) nos homens e 150.5 cm nas mulheres ⁽⁶¹⁾. O estudo longitudinal realizado por Ranke *et al.*, em 1988, avaliou 144 pacientes e registrou 392 medições em 89 pacientes do sexo masculino e 355 medidas nas 55 pacientes do sexo feminino desde o nascimento até os 19 anos. A média de altura em ambos os sexos manteve-se paralela ao percentil 3 da curva de referência para população normal até cerca de 12 anos nos meninos e 10 anos nas meninas. Posteriormente, altura média caiu abaixo da faixa de normalidade, atingindo 162,5 e 152,7 cm nos homens e mulheres adultos, respectivamente. Esse declínio foi resultado do atraso puberal observado nesses pacientes. Em concordância com essa observação, a idade óssea também apresentou um atraso de 2 anos em relação à idade cronológica. A curva de crescimento proposta por Ranke *et al.* é utilizada como padrão de referência da SN até o momento ⁽¹⁵⁾.

A secreção espontânea e após estímulo farmacológico de GH na SN é normal ⁽⁶²⁾. Em relação ao eixo GH-IGF-1, os níveis de IGF-1 estão baixos ou no limite inferior da normalidade ^(21, 63, 64), enquanto os níveis de IGFBP-3, em geral, estão normais ^(64, 65).

O GH é essencial para o crescimento pós-natal e exerce sua ação através da ligação a receptores específicos que fosforilam resíduos de

tirosina localizados no domínio intracelular. A desfosforilação dos resíduos de tirosina resulta na interrupção fisiológica da via de sinalização do GH. Dessa forma, o aumento da atividade da SHP-2 observado em pacientes com SN com mutação no *PTPN11* pode levar a diminuição da ação do GH e, consequentemente, influenciar negativamente o crescimento linear. Essa observação, em conjunto com os baixos níveis de IGF-1, sugere a presença de insensibilidade parcial ao GH nos pacientes com SN com mutação no gene *PTPN11* ^(21, 63, 65). Os primeiros trabalhos que avaliaram a resposta ao tratamento com rhGH em pacientes com mutação no *PTPN11*, mostraram uma piora da resposta a curto prazo nos pacientes com mutação em comparação aos pacientes sem mutação no gene *PTPN11* ^(21, 63, 65), embora esta observação não tenha sido confirmada em um recente trabalho que avaliou a resposta ao rhGH após 3 anos de terapia em pacientes com mutação no *PTPN11* ⁽⁶⁶⁾.

Em resumo, a SN é uma síndrome comum e um importante diagnóstico diferencial em crianças com baixa estatura, criptorquidismo e atraso puberal, condições frequentemente vistas por endocrinologistas. Mutações germinativas que afetam componentes da via de sinalização RAS/MAPK estão envolvidas na patogênese da SN e atualmente podem ser diagnosticadas por análise molecular. Frente a este novo conhecimento, a avaliação do crescimento (linear e ponderal) em relação ao defeito molecular da SN e da correlação genótipo-fenótipo são, ainda, necessárias para melhor caracterizar o efeito da desregulação da via RAS/MAPK nos sistemas endócrino e metabólico.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o padrão de crescimento linear e ponderal na síndrome de Noonan em pacientes portadores de mutações nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*
 - Construir uma curva de referência da altura e do índice de massa corpórea (IMC) para idade e sexo na síndrome de Noonan em pacientes portadores de mutações nos genes causadores
 - Determinar a correlação entre o genótipo-fenótipo na síndrome de Noonan em relação à:
 - Intensidade da baixa estatura
 - IMC
 - Eixo GH / IGF-1
-

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. Consentimentos, por escrito, foram obtidos de todos os pacientes ou de pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados. O protocolo de estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da instituição (CEP 0176/08).

3.2 Casuística

3.2.1 Pacientes

Foram selecionados 152 pacientes com Síndrome de Noonan acompanhados em conjunto na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, na Unidade de Genética do Instituto da Criança e na Unidade de Cardiopatias Congênitas do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Sessenta e oito pacientes foram descritos previamente ^(67, 68). As características clínicas dos 152 pacientes estão descritas na Tabela 4. Todas as pacientes do sexo feminino apresentaram cariótipo normal (46, XX).

Tabela 4: Características clínicas dos pacientes com síndrome de Noonan selecionados para o estudo

	Pacientes com Síndrome de Noonan
N	152
Sexo (M:F)	2:1
Deformidade torácica (%)	61
<i>Pectus excavatum</i> (%)	34
<i>Pectus carinatum</i> (%)	33
<i>Carinatum + excavatum</i> (%)	34
Cardiopatía (%)	76
Estenose de valva pulmonar (%)	55
Miocardiopatía Hipertrófica (%)	14
Outras cardiopatías (%)	31
Z da altura	-2.5 ± 1.3
Baixa estatura (%)	66
Criptorquidia uni ou bilateral (%)	54

3.3 Avaliação hormonal

A dosagem do GH foi determinada por meio de fluoroimunoensaio com anticorpos monoclonais (AutoDELFIA, Wallac, Turku, Finland). Os ensaios foram padronizados com o padrão internacional 80/505 da Organização Mundial de Saúde, e concentrações de 0.1 a 38 nanogramas

por ml (ng/ml) apresentaram coeficiente de variação inter-ensaio menor do que 10%. O teste da clonidina foi utilizado para avaliar a liberação de GH e concentrações de GH acima de 3.3 ng/ml excluía deficiência de GH, baseado em estudo de crianças normais realizado em nosso laboratório ⁽⁶⁹⁾.

As concentrações de IGF-1 e IGFBP-3 foram determinadas por radioimunoensaio (DSL. Webster, TX, USA) ou ensaio de quimioluminescência (IMMULITE, Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA).

Os valores de IGF-1 e IGFBP-3 foram expressos como escore de desvio-padrão (Z) em relação ao padrão de normalidade para sexo e idade fornecidos pelos respectivos “kits”.

3.4 Estudo Molecular

O estudo molecular foi realizado em colaboração com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor/HC/FMUSP). O estudo do *RAF1* foi realizado exclusivamente no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42. O estudo molecular dos genes *KRAS* e *SOS1* foi realizado pela bióloga Amanda Salem Brasil sob orientação da Dra. Débora Romeo Bertola e Dr. Alexandre Pereira, como parte de sua Dissertação de Mestrado e Tese de Doutorado (em progresso). O estudo do *PTPN11* foi realizado igualmente nos dois serviços acima mencionados.

A estratégia do estudo visou à eficácia de identificação das mutações nos genes relacionados. Para esse propósito, os pacientes foram inicialmente pesquisados para mutações localizadas nos éxons 3, 8 e 13 do gene *PTPN11*. Aqueles negativos para mutações foram, de forma simultânea, pesquisados para mutações nos éxons remanescentes do gene *PTPN11*, para mutações no gene *KRAS* e para mutações nos éxons 7, 14 e 17 do gene *RAF1*. Os pacientes negativos para mutações foram pesquisados para mutações no gene *SOS1* e para mutações nos éxons remanescentes do gene *RAF1* (Figura 7).

Figura 7: Fluxograma da estratégia de estudo

3.4.1 Preparação das amostras do DNA genômico de leucócitos periféricos

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos indivíduos arrolados na pesquisa. Dez mililitros (ml) de sangue venoso foram colhidos em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se um volume de solução de lise (NH_4Cl a 114 mM, NH_4HCO_3 a 1 mM) duas vezes maior que o volume de sangue, incubado a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 4000 g (Sorvall, RT7, Germany), sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido uma vez.

O botão de células brancas foi suspenso em 9 ml de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 180 μL de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 μL de proteinase K na concentração de 10 mg/ml (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), e incubado a 37°C por 18 horas. Após este período, 3,6 ml de solução saturada de NaCl a 6 M foi adicionada, seguido de agitação do conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 4000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado, acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo. Em seguida, lavado em etanol a 70% durante 5 minutos, repetindo-se a operação por mais três

vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto, seguido de secagem por centrifugação a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após o procedimento, o DNA foi ressuspensão em tampão TE a 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Pares de *primers* foram desenhados para amplificar toda a região codificadora dos genes *PTPN11*, *KRAS*, *SOS1* e *RAF1*. As sequências dos pares de *primers* utilizados para realização do estudo molecular, assim como, a temperatura de hibridização, estão descritas no Anexo A.

Em cada reação de PCR foram amplificados 50-100 ng do DNA genômico utilizando 200 μ M de cada trifosfato de nucleotídeo (dNTP), 20 pmol/ μ l de cada *primer* específico, além do tampão (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 50mM KCl) e *Taq* DNA polimerase 2,5 U (Pharmacia, Upsala, Sweden) para um volume final de 25 μ l. Para amplificação do éxon 1 do gene *PTPN11* acrescentou-se 2,5 μ l de DMSO a 10%.

As amostras de DNA foram amplificadas por desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguido por 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de hibridização específica para cada par de *primer* por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e no último ciclo 10 minutos a 72 °C para extensão final. Utilizou-se um termociclador automático GeneAmp PCR Instrument System 9700 (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT).

Para o éxon 1 do *PTPN11*, foi realizada reação com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos seguido por hibridização de 67°C por 3 minutos. Todas as amplificações foram acompanhadas de 2 controles negativos. As amostras amplificadas foram identificadas em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/ml de gel, observadas em transiluminador ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid® (667 - 3 ¼ X 4 ¼).

3.4.3 Sequenciamento Automático

A concentração dos produtos gerados pela PCR foi estimada através da comparação com fragmentos do marcador de peso molecular de concentração conhecida (Low DNA mass) em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2 U/µl) e éxonuclease I (10 U/µl) (*PCR product pre-sequencing kit*, Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA) com incubação a 37°C por 15 minutos seguido de 80°C por mais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit ABI Prism™ BigDye Terminator (Perkin Elmer) e quantidades variáveis de produto de PCR (10 a 100 ng) foram utilizadas de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA).

3.5 Análises estatísticas

3.5.1 Construção da curva de referência para síndrome de Noonan

A construção da curva de referência considerou a distribuição das variáveis altura e IMC para cada idade e sexo. A altura apresenta distribuição normal, ao contrário do IMC, que apresenta distribuição não-gaussiana. Para evitar distorções nos limites extremos da avaliação (percentil 3 e 97), foi utilizado o método proposto por Cole *et al.*, conhecido como método *lambda, mu, sigma* (LMS), que leva em consideração essa diferença na distribuição, convertendo os dados antropométricos para uma distribuição normal e promovendo uma correção entre os valores de cada faixa etária para o efeito de suavização da curva. São utilizadas 3 curvas relacionadas à idade: a curva da mediana (curva M), a curva do coeficiente de variação do dado original à medida que ele muda com a idade (curva S) e a curva derivada da transformação da variável para uma distribuição gaussiana (curva L) ⁽⁷⁰⁾.

A tabela de valores correspondentes de L, M e S para altura e IMC permite o cálculo de qualquer percentil ou SDS usando uma fórmula simples que combina os valores L, M e S em qualquer idade:

$$C_{100\alpha}(t) = M(t) [1 + (L(t) S(t) Z\alpha)]^{1/L(t)}$$

Onde $C_{100\alpha}(t)$ é o percentil correspondente à $Z\alpha$, o equivalente normal à área (α) da curva e t é a idade em anos.

Os percentis obtidos podem ser convertidos diretamente para escore do desvio-padrão (Escore-Z). A tabela com os valores correspondentes de L, M e S da altura e IMC para cada idade e sexo está disponível no Anexo B. O método LMS para construção de curvas de referência para populações específicas está disponível no *software Growth Analyser* versão 3.5 (Ed. Dutch Growth Foundation, Rotterdam, Netherlands).

As avaliações antropométricas foram realizadas no mesmo período do dia e incluíram medidas da altura (medida com estadiômetro) e do peso (medido com balança digital). O comprimento de crianças menores de dois anos foi medido em decúbito dorsal totalmente estendido. Cada criança contribuiu com apenas uma medida para cada faixa etária. O intervalo mínimo entre duas avaliações foi de 6 meses. A altura final foi definida quando a velocidade de crescimento era menor que 0,5 centímetros por ano (cm/ano) após um período de observação de pelo menos 12 meses e/ou a idade óssea indicava fechamento da cartilagem epifisária. Nenhum dos pacientes estava em uso de hormônio do crescimento durante o período de avaliação.

3.5.2 Comparação entre grupos

Peso e comprimento ao nascimento foram expressos em Escore-Z para idade gestacional e sexo ⁽⁷¹⁾, assim como a altura e IMC foram expressos em Escore-Z para idade e sexo ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾.

Os pacientes foram comparados conforme o genótipo através do teste *t* não pareado ou ANOVA seguido pelo teste de Tukey para as variáveis numéricas, conforme apropriado. As variáveis numéricas que não demonstraram distribuição paramétrica foram analisadas por Kruskal-Wallis, ANOVA *one-way on Ranks* ou Mann-Whitney *Rank Sum Test*. Variáveis nominais foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, conforme apropriado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas com SigmaStat versão 3.5 (Systat Software Inc. Chicago, IL) e Medicalc (versão 11.1.1.0, MedCalc Software bvba, Mariakerke, Belgium).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das mutações encontradas

O estudo molecular identificou 99 pacientes (65%) com mutações nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*. A frequência das mutações encontradas nos pacientes com SN está resumida na Tabela 5.

Tabela 5: Frequência das mutações nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS* nos 152 pacientes estudados

Gene	<i>PTPN11</i>	<i>SOS1</i>	<i>RAF1</i>	<i>KRAS</i>	TOTAL
Mutações encontradas					
Número total	71	13	10	5	99
Porcentagem	47	9	7	3	65
Intervalo de confiança (5-95%)	39 - 55	4 - 13	3 - 11	0-6	57 – 73
Frequência na literatura (%)*	29 - 60	12 - 26	5 - 17	2-4	60-70

*(3, 14, 24-26, 28, 29)

4.1.1 *PTPN11*

O sequenciamento do *PTPN11* não revelou alterações na sequência dos éxons 1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 14 e 15 em relação à sequência controle. Em relação aos outros éxons, foram encontradas trinta mutações missense diferentes em 71 dos 152 pacientes com SN (47%). A maioria das mutações concentrou-se nos éxons 3, 8 e 13 (92%). Dois pacientes apresentaram uma variante alélica sinônima, p.H85H no éxon 3 e p.D469D no éxon 12. As mutações no gene *PTPN11* encontradas nos pacientes com SN estão resumidas na Tabela 6.

Tabela 6: Mutações identificadas no gene *PTPN11* nos pacientes com SN

Éxon	N	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Códon	Domínio
3	4	c.172A>G	Asn (N) > Asp (D)	58	N-SH2
3	3	c.179G>C	Gly (G) > Ala (A)	60	N-SH2
3	1	c.179G>T	Gly (G) > Cys (C)	60	N-SH2
3	3	c.181G>A	Asp (D) > Asn (N)	61	N-SH2
3	1	c.182A>G	Asp (D) > Gly (G)	61	N-SH2
3	2	c.184T>G	Tyr (Y) > Asp (D)	62	N-SH2
3	5	c.188A>G	Tyr (Y) > Cys (C)	63	N-SH2
3	1	c.205G>C	Glu (E) > Gln (Q)	69	N-SH2
3	1	c.206A>T	Glu (E) > Val (V)*	69	N-SH2
3	3	c.215C>G	Ala (A) > Gly (G)	72	N-SH2
3	2	c.218C>T	Thr (T) > Ile (I)	73	N-SH2
3	3	c.236A>G	Gln (Q) > Arg (R)	79	N-SH2
3	1	c.317A>C	Asp (D) > Ala (A)	106	Linker
4	3	c.417G>C	Glu (E) > Asp (D)	139	C-SH2
7	1	c.836A>G	Tyr (Y) > Cys (C)	279	PTP
7	1	c.844A>G	Ile (I) > Val (V)	282	PTP
8	2	c.853T>C	Phe (F) > Ser (S)	285	PTP
8	16	c.922A>G	Asn (N) > Asp (D)	308	PTP
8	5	c.923A>G	Asn (N) > Ser (S)	308	PTP
8	1	c.923A>C	Asn (N) > Thr (T)	308	PTP
12	1	c.1403C>T	Thr (T) > Met (M)	468	PTP
13	2	c.1471C>A	Pro (P) > His (H)	491	PTP
13	1	c.1471C>T	Pro (P) > Ser (S)	491	PTP
13	1	c.1492C>T	Arg (R) > Gln (Q)	498	PTP
13	1	c.1505A>G	Ser (S) > Leu (L)	502	PTP
13	1	c.1507G>A	Gly (G) > Arg (R)	503	PTP
13	2	c.1510A>G	Met (M) > Val (V)	504	PTP
13	1	c.1513A>G	Val (V) > Met (M)	505	PTP
13	1	c.1529A>C	Gln (Q) > Pro (P)	510	PTP
13	1	c.1529A>G	Gln (Q) > Arg (R)	510	PTP

Ala= alanina; Asn= asparagina; Asp= ácido aspártico; Arg= arginina; Cys= cisteína; Gln= glutamina; Glu= ácido glutâmico; Gly= glicina; His= histidina; Ile= isoleucina; Leu = Leucina; Met= metionina; Phe= fenilalanina; Pro= prolina; Ser= serina; Thr= treonina; Tyr= tirosina; Val= valina.

* - Mutação somática previamente descrita em leucemia.

4.1.2 KRAS

Dos 81 pacientes PTPN11 negativos, 80 foram sequenciados para pesquisa de mutações no gene KRAS conforme protocolo estabelecido. Uma paciente com alíquota de DNA insuficiente foi priorizada para pesquisa no gene RAF1 devido à presença de miocardiopatia hipertrófica. Não foram encontradas alterações em relação à sequência controle em 42 pacientes. Cinco pacientes apresentaram mutações missense em heterozigose no gene KRAS (Tabela 7). Os 33 pacientes restantes apresentaram os seguintes polimorfismos identificados: IVS5 -9 C>T (rs 12313763), c.704 T>C (rs 17473423) e IVS4 +92 A>G (Tabela 8). Os três polimorfismos descritos encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com frequência alélica de, pelo menos, 10%.

Tabela 7: Mutações identificadas no gene *KRAS* nos pacientes com SN

Éxon	Paciente	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Códon	Domínio
2	3	c.40G>A	Val (V) > Ile (I)	14	P loop
3	1	c.385A>C	Met (M)> Leu (L)	72	H_N_K_Ras_like
6	1	c.458A>T	Asp (D) > Val (V)	153	Hélice α5

Asp= ácido aspártico; Ile= isoleucina; Leu = leucina; Met= metionina; Val= valina.

Tabela 8: Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *KRAS* nos 65 pacientes avaliados com mutação no gene *PTPN11*

	Íntron 4		Íntron 5		Éxon 6	
Troca de base	A>G		C>T		T>C	
Nucleotídeo	+92		-9		704	
Identificação SNP	rs 76433096		rs 12313763		rs 17473423	
Frequência alélica (%)	A	92	C	95	T	78
	G	8	T	5	C	22
Frequência genotípica da população de estudo (%)	A/A	83	C/C	89	T/T	58
	A/G	17	C/T	11	T/C	39
	G/G	0	T/T	0	C/C	3
Frequência genotípica da população controle (%)	A/A	65	C/C	84	T/T	58
	A/G	35	C/T	16	T/C	35
	G/G	0	T/T	0	C/C	7

4.1.3 *RAF1*

Foram selecionados 76 pacientes com SN sem mutações nos genes *PTPN11* e *KRAS* para pesquisa de mutações nos éxons 7, 14 e 17 do gene *RAF1*. Dez pacientes do total de 152 (7%) apresentaram mutações *missense* em heterozigose localizadas no éxon 7 (Tabela 9). Uma paciente apresentou a variante alélica p.V647V, no éxon 17, causada pela troca de T>C no códon 647.

Tabela 9: Mutações identificadas no gene *RAF1* nos pacientes com SN

Éxon	Paciente	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Códon	Domínio
7	7	c.770C>T	Ser (S) > Leu (L)	257	CR2
7	2	c.781C>T	Pro (P) > Ser (S)	261	CR2
7	1	c.781C>G	Pro (P) > Ala (A)	261	CR2

Ala = alanina; Leu= leucina; Pro= prolina; Ser= serina

A pesquisa dos éxons remanescentes foi realizada somente nos pacientes sem mutações identificadas nos genes *PTPN11*, *KRAS*, *RAF1* e *SOS1* (n = 53). Nenhuma mutação adicional foi encontrada neste grupo de pacientes.

4.1.4 *SOS1*

Foram selecionados 66 pacientes para pesquisa de mutações no gene *SOS1*, sendo identificadas alterações na sequência dos éxons 5, 6, 10, 14 e 16 em relação à sequência controle. Foram encontradas nove mutações *missense* diferentes em 13 dos 152 pacientes com SN (9%) (Tabela 10). Treze pacientes apresentaram variantes alélicas consideradas polimorfismos: um paciente apresentou a variante alélica p. P17P no éxon 1, sete a p.R65R, no éxon 2, três a p.P655L, no éxon 12, um paciente a p.M997M no éxon 19 e um paciente a p.N999N no éxon 19.

Tabela 10: Mutações identificadas no gene *SOS1* nos pacientes com SN

Éxon	Paciente	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Códon	Domínio
5	1	c.570G>A	Asp (D) > Glu (E)	190	DH
6	1	c.797C>A	Thr (T) > Lys (K)	266	DH
6	1	c.806T>G	Met (M) > Arg (R)	269	DH
6	3	c.806T>C	Met (M) > Thr (T)	269	DH
10	2	c.1654A>G	Arg (R) > Gly (G)	552	PH-REM
10	1	c.1655G>C	Arg (R) > Thr (T)	552	PH-REM
10	2	c.1656G>C	Arg (R) > Ser (S)	552	PH-REM
14	1	c.2184A>T	Lys (K) > Ile (I)	728	CDC25
16	1	c.2536G>A	Glu (E) > Lys (K)	846	CDC25

Ala= alanina; Asp= ácido aspártico; Arg= arginina; Glu= ácido glutâmico; Gly= glicina; Ile= isoleucina; Lys= lisina; Met= metionina; Ser= serina; Thr= treonina.

4.2 Análise do padrão de crescimento linear nos pacientes com mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*

4.2.1 Análise do comprimento e peso ao nascimento

As informações sobre peso e comprimento ao nascimento foram disponíveis em 90 e 65 pacientes com mutações identificadas, respectivamente. Setenta e nove (88%) crianças nasceram entre as semanas 37-42^a semana de idade gestacional, enquanto 11 crianças (12%) nasceram prematuras sem causas determinadas. Independente do genótipo, os pacientes apresentaram peso e comprimento ao nascimento, normais para idade gestacional, embora o comprimento ao nascimento fosse um pouco comprometido: a média do peso de nascimento foi de 3.152 ± 569 g (Escore-Z = -0.3 ± 2.2), enquanto a média do comprimento ao nascer foi de $48,0 \pm 3,0$ cm (Escore -Z = $-1,3 \pm 1.3$) nos pacientes com mutações identificadas.

4.2.2 Construção da curva de referência

Para construção da curva de referência, foram selecionados os pacientes com mutações identificadas nos genes relacionados, os quais foram acompanhados longitudinalmente, resultando em 379 medidas (em média, 4 medidas por paciente). Oito pacientes foram avaliados somente na idade adulta. Para o estudo da altura final, foram considerados 31 pacientes

que preenchiam os critérios descritos anteriormente. As variáveis analisadas foram Z-altura e Z-IMC. Os dados de crescimento para cada faixa etária estão resumidos na Tabela 11.

Os valores obtidos dos percentis selecionados referentes à altura e IMC, obtidos para cada idade, estão apresentados no Anexo B. As curvas construídas da Altura x Idade para o sexo feminino e masculino juntamente com as curvas do IMC x Idade para o sexo feminino e masculino estão apresentadas no Anexo C. As curvas construídas Altura x Idade e IMC x Idade para o sexo masculino foram sobrepostas às curvas de referência e estão expostas no Anexo D.

A altura final atingida nos pacientes com mutações identificadas foi de 157.8 ± 9.2 cm no sexo masculino e de 147.9 ± 7.0 cm no sexo feminino, correspondendo a um Z-altura de -2.3 e -2.2 para os brasileiros adultos saudáveis do sexo masculino e feminino, respectivamente ⁽⁷³⁾. Esse resultado mostra uma diferença de 10 centímetros entre os sexos. Em relação ao IMC dos pacientes com SN na idade adulta, a média dos valores observados corresponde a -0.6 e -0.7 desvios-padrão da média observada para brasileiros do sexo masculino e feminino, respectivamente ⁽⁷³⁾.

Tabela 11: Dados longitudinais de crescimento dos pacientes com mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*

Faixa etária (anos)	N (M:F)	Z-altura ⁽⁷²⁾	Z-altura SN ⁽¹⁵⁾	Z-IMC ⁽⁷⁴⁾
0-0.9	07:03	-2.8 ± 1.3	-	-
1-1.9	10:13	-2.6 ± 1.3	-0.4 ± 1.2	-
2-2.9	9:7	-2.2 ± 1.8	-0.4 ± 1.6	-0.2 ± 1.4
3-3.9	14:11	-2.3 ± 1.3	-0.5 ± 1.0	0.3 ± 1.3
4-4.9	19:9	-1.8 ± 1.0	0.0 ± 1.0	-0.1 ± 1.0
5-5.9	17:7	-2.5 ± 1.2	-0.8 ± 1.3	0.0 ± 1.0
6-6.9	15:8	-1.9 ± 1.0	-0.1 ± 1.2	-0.1 ± 1.2
7-7.9	16:7	-2.1 ± 1.0	-0.2 ± 1.1	-0.3 ± 1.1
8-8.9	16:06	-2.1 ± 1.2	-0.2 ± 1.3	-0.4 ± 0.8
9-9.9	11:12	-2.2 ± 1.0	-0.3 ± 1.1	-0.5 ± 1.0
10-10.9	11:10	-2.4 ± 0.9	-0.7 ± 1.1	-0.8 ± 1.2
11-11.9	08:09	-2.4 ± 1.1	-0.6 ± 1.2	-0.9 ± 1.0
12-12.9	10:09	-2.6 ± 1.0	-0.7 ± 1.2	-1.2 ± 0.9
13-13.9	14:10	-3.0 ± 1.1	-0.9 ± 1.1	-1.0 ± 1.0
14-14.9	13:03	-3.2 ± 1.1	-1.1 ± 1.4	-1.3 ± 0.6
15-15.9	12:04	-2.7 ± 1.4	-0.3 ± 1.5	-1.1 ± 1.0
16-16.9	06:03	-3.5 ± 1.0	-0.9 ± 0.9	-1.8 ± 1.1
17-17.9	13:04	-3.1 ± 1.6	-0.8 ± 1.4	-1.5 ± 1.2
18-18.9	08:04	-3.0 ± 1.3	-0.9 ± 1.1	-1.3 ± 0.9
19-19.9	05:03	-2.4 ± 1.2	-0.4 ± 1.1	-0.5 ± 1.0
>20	18:12	-2.5 ± 1.1	-0.4 ± 1.1	-0.4 ± 1.0

4.2.3 Análise da correlação genótipo-fenótipo

4.2.3.1 Comparação entre os pacientes com mutações nos genes relacionados e os pacientes sem mutações identificadas

A correlação genótipo-fenótipo foi avaliada entre os pacientes com mutação e sem mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS* e *RAF1*, considerando-se as variáveis de crescimento pré- e pós-natal e a frequência e tipo de cardiopatia. As características clínicas dos pacientes estão apresentadas na Tabela 12.

Os pacientes com mutação nos genes causadores da SN apresentaram maior frequência de cardiopatias congênitas em relação aos pacientes sem mutação identificada. Não foi observada diferença em relação à frequência de miocardiopatia hipertrófica, porém, os pacientes sem mutação identificada apresentaram menor frequência de estenose de valva pulmonar e maior frequência de outros tipos cardiopatias menos típicos da SN, como defeitos do septo atrioventricular, coartação de aorta, tetralogia de Fallot e anomalia de Ebstein.

Tabela 12: Características clínicas entre os pacientes com e sem mutação nos genes relacionados

	Sem mutação	Com mutação	P
Sexo (M:F)	36:17	61:38	
Idade Gestacional	38 ± 2.2	38 ± 1.7	NS
Frequencia de prematuridade	9/41 (22)	11/91 (12)	NS
Z-Peso de nascimento	0.2 ± 2.0	-0.3 ± 2.2	NS
Z-Comprimento de nascimento	-1.1 ± 1.4	-1.3 ± 1.3	NS
Z-Comprimento de nascimento < -2 (%)	8/34 (24)	11/65 (17)	NS
Idade (anos) na 1ª avaliação	9.3 ± 5.5	9.4 ± 6.8	NS
Baixa Estatura (%)	33/53 (62)	64/99 (65)	NS
Z-altura	-2.3 ± 1.6	-2.5 ± 1.2	NS
Z-IMC	-0.6 ± 1.2	-0.5 ± 1.1	NS
Cardiopatia Congênita (%)	33/51 (65)	78/96 (81)	0.04
Miocardiopatia Hipertrófica	4 (12)	13 (17)	NS
Estenose Pulmonar	13 (39)	54 (69)	0.006
Outras cardiopatias	16 (48)	11 (14)	0.008

4.2.3.2 Análise do crescimento dos pacientes com mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*

As características clínicas dos pacientes com mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS* estão apresentadas na Tabela 13.

A análise do crescimento pré-natal mostrou que não houve diferenças na frequência de prematuridade entre os genótipos. O peso de nascimento de pacientes afetados por mutação no gene *RAF1* (1.2 ± 1.8) foi maior em relação aos pacientes com *PTPN11* (-0.2 ± 1.4 , $p=0.03$) e *SOS1* (-0.4 ± 1.2 , $p = 0,04$).

O comprimento de nascimento não mostrou diferenças entre os genótipos, assim como a frequência de comprimento ao nascimento ≤ -2 .

A comparação entre as variáveis de crescimento linear e o IMC dos pacientes com mutações identificadas foi realizada usando como referência para cálculo do Escore-Z os valores obtidos para o percentil 50 da curva construída neste estudo (Anexo B). Não foram encontradas diferenças em relação ao Z-altura e ao Z-IMC entre o sexo masculino e o sexo feminino.

Considerando o crescimento pós-natal, os pacientes com mutações no *SOS1* (Z-altura = $0,5 \pm 0,8$) eram mais altos que os pacientes com mutação no *RAF1* ($-0,5 \pm 0,8$; $p < 0,001$) e *PTPN11* ($0,1 \pm 1,1$; $p = 0,007$) enquanto os pacientes com mutações *RAF1* foram menores do que os pacientes com mutações *PTPN11* ($p = 0,002$; Figura 8).

Os valores de IMC foram mais altos nos pacientes com mutações *RAF1* (Z-IMC = $0,8 \pm 0,8$; $p < 0,001$) do que em pacientes com outros genótipos. Os pacientes com mutação no gene *KRAS* apresentaram o menor IMC ($-0,8 \pm 1,0$; $p < 0,001$) em comparação com outros genótipos (Figura 9).

Tabela 13: Características clínicas dos pacientes com mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*

	<i>PTPN11</i>	<i>SOS1</i>	<i>RAF1</i>	<i>KRAS</i>
Sexo (M:F)	44:27	8:5	5:5	5:0
Idade Gestacional	38 ± 1.6	38 ± 1.7	38 ± 2.3	37.5 ± 1.9
Frequencia de prematuridade	12	8	20	25
Z-Peso de nascimento	-0.2 ± 1.4	-0.4 ± 1.2	1.2 ± 1.8*†	1.1 ± 0.7
Z-Comprimento de nascimento	-1.1 ± 1.0	-2.1 ± 2.1	-1.2 ± 1.2	-0.3 ± 1.0
Z-Comprimento de nascimento < -2 (%)	18	33	11	0
Idade (anos) na 1ª avaliação	9.6 ± 6.3	12.8 ± 9.3	7.3 ± 5.1	5.4 ± 6.5
Baixa Estatura (%)	70	42	80	20
Z-altura	0.1 ± 1.1 [£]	0.5 ± 0.8 ^{#¥}	-0.5 ± 0.8	-0.1 ± 1.0
Z-IMC	-0.6 ± 1.2	-0.5 ± 0.9	0.7 ± 1.2	-1.1 ± 2.1
Cardiopatias Congênitas (%)	77	92	100	67
Miocardiopatia Hipertrófica	7	0	90 [¶]	0
Estenose Pulmonar	76	91	10 [¶]	50
Outras cardiopatias	16	9	0	50

* *RAF1* vs. *SOS1*, $p = 0,04$; † *RAF1* vs. *PTPN11*, $p = 0,03$; # *SOS1* vs. *RAF1*, $p < 0.001$; ¥ *SOS1* vs. *PTPN11*, $p = 0.007$; £ *PTPN11* vs. *RAF1*, $p = 0.002$; ¶ *RAF1* vs. *PTPN11* e *SOS1*, $p < 0.001$

Figura 8: Comparação do Z-altura entre os genótipos

*SOS1 vs. RAF1, $p = <0,001$; **SOS1 vs. PTPN11, $p = 0,007$; #PTPN11 vs. RAF1, $p = 0,002$

Figura 9: Comparação do Z-IMC entre os genótipos

* RAF1 vs. outros genótipos, $p < 0,001$; † KRAS vs. outros genótipos, $p < 0,001$

4.2.3.3 Correlação genótipo-fenótipo em relação ao tipo de mutação do *PTPN11*

Baseado em estudos prévios da literatura ^(44, 75), classificamos as mutações no *PTPN11* conforme o seu efeito sobre a atividade tirosina fosfatase constitutiva da SHP-2 em:

1- Mutações com menor atividade constitutiva:

- p.F285S, p.N308D/S/T, p.T468M, p.P491H/S, p.R498Q, p.M504V

2- Mutações com maior atividade constitutiva:

- p.N58D, p.G60A, p.D61G/N, p.Y62D, p.Y63C, p.A72G, p.T73I, p.Q79R

Não foram encontradas diferenças significativas entre as mutações com maior ou menor atividade fosfatase constitutiva em relação às variáveis de crescimento e em relação ao tipo e frequência de cardiopatia. Mesmo quando analisamos as mutações que apresentam maior número de pacientes e a atividade tirosina-fosfatase bem caracterizada, não se observou correlação genótipo fenótipo (Tabela 14).

Tabela 14: Características clínicas dos pacientes com mutação no *PTPN11* com maior ou menor atividade constitutiva tirosina fosfatase da SHP-2

Atividade PTP	Maior atividade constitutiva	Menor atividade constitutiva	p
N	29	31	NS
Cardiopatía (%)	24 (83)	23 (74)	NS
EVP (%)	19 (79)	19 (83)	NS
MCH (%)	1 (4)	2 (9)	NS
Outros (%)	4 (17)	2 (9)	NS
IC (anos)	9.6 ± 4.2	10.5 ± 7.5	NS
Z-Altura	-2.9 ± 1.2	-2.4 ± 1.1	NS
Z- altura < -2 (%)	22 (76)	21 (68)	NS

PTP – tirosina fosfatase; EVP – Estenose de valva pulmonar; MCH – Miocardiopatía Hipertrófica; IC – idade cronológica; NS – não significante.

4.2.3.4 Análise da influência dos polimorfismos do gene *KRAS* sobre o fenótipo dos pacientes com mutação no gene *PTPN11*

Para avaliar a possibilidade dos polimorfismos encontrados no gene *KRAS* exercerem uma modulação no fenótipo dos pacientes com mutação no gene *PTPN11*, o sequenciamento do gene *KRAS* foi ampliado para os 71 pacientes com mutação no gene *PTPN11*. As variáveis analisadas foram: Z- altura, Z-MC e as frequências de cardiopatía e de baixa estatura (BE, Z- altura ≤ -2). Todos os três polimorfismos encontrados não apresentaram diferenças em relação ao fenótipo cardíaco ou de baixa estatura (Tabela 15).

A influência da presença dos polimorfismos encontrados no gene *KRAS* (IVS4 +92 A>G, IVS5 -9 C>T e c.704 T>C) sobre o fenótipo dos

pacientes com mutação no gene *PTPN11* também foi investigada. As variáveis fenotípicas analisadas foram: tipo e frequência de cardiopatia e comprometimento da estatura. Não foram encontradas correlações entre a presença dos polimorfismos do gene *KRAS* e o fenótipo dos pacientes com mutação no gene *PTPN11*.

Tabela 15: Características clínicas dos 40 pacientes com mutação no *PTPN11* e polimorfismos no gene *KRAS*

	Íntron 4		Íntron 5		Éxon 6	
ID	rs 76433096		rs 12313763		rs 17473423	
Genótipo	A/A	A/G	C/C	C/T	T/T	T/C
N	29	11	33	7	14	25
Frequência de Cardiopatia (%)	20 (69)	10 (91)	20 (83)	4 (57)	11 (79)	19 (76)
Z-Altura	-2.5 ± 1.2	-2.9 ± 1.2	-2.7 ± 1.1	-2.1 ± 1.1	-2.7 ± 1.2	-2.5 ± 1.2
Frequência de BE (%)	19 (66)	9 (82)	25 (76)	6 (86)	10 (71)	17 (68)
Z-IMC	-0.7 ± 1.3	-0.8 ± 1.1	-0.8 ± 1.3	-0.3 ± 1.0	-0.8 ± 1.1	-0.7 ± 1.3

BE: Baixa estatura

4.2.3.5 Análise do fenótipo das mutações mais frequentemente encontradas nos genes *PTPN11* e *RAF1*

A mutação p.N308D foi a mais frequentemente observada em nossa casuística de pacientes com mutação no gene *PTPN11*, enquanto a mutação p.S257L foi a mutação mais frequentemente encontrada entre os pacientes portadores de mutação no gene *RAF1*. As características clínicas dos pacientes com ambas mutações estão resumidas na Tabela 16.

A comparação entre os pacientes portadores dessas 2 mutações resultou na observação de diferenças em relação ao tipo cardiopatia característico de cada mutação. Enquanto a mutação p.N308D é caracterizada pela presença de EVP, a mutação p.S257L é caracterizada pela presença de miocardiopatia hipertrófica. Além disso, os pacientes carreadores da mutação p.S257L apresentam maior comprometimento da altura em relação aos pacientes portadores da mutação p.N308D.

Tabela 16: Características clínicas dos pacientes carreadores das duas mutações mais frequentes na casuística de pacientes com SN: p.N308D do gene *PTPN11* e p.S257L do gene *RAF1*

	Pacientes com mutação p.N308D do gene <i>PTPN11</i>	Pacientes com mutação p.S257L do gene <i>RAF1</i>	P
N	16	7	NS
Deformidade torácica (%)	10 (62)	4 (57)	NS
Pectus Excavatum (%)	4 (40)	1 (25)	NS
Pectus Carinatum (%)	2 (20)	1 (25)	NS
Carinatum + Excavatum (%)	4 (40)	2 (50)	NS
Cardiopatia Congênita (%)	10 (62)	7 (100)	NS
Estenose de valva pulmonar (%)	10 (100)	0	0.007
Miocardiopatia Hipertrófica (%)	0	7 (100)	<0.001
Baixa estatura (%)	11 (69)	7 (100)	NS
Z-altura	-2.4 ± 0.7	-3.1 ± 0.5	0.03

4.2.4 Análise do eixo GH / IGF-1

4.2.4.1 Análise das concentrações de GH após estímulo farmacológico

Foi realizado o teste da clonidina em 70 pacientes que se encontravam pré-púberes no momento da primeira avaliação. A concentração do pico de GH variou de 3.4 a 38.4 ng/ml, com média de 13 ± 8.0 ng/ml. Nenhum paciente apresentou deficiência de hormônio de crescimento. Não houve diferença significativa entre o pico de GH entre os pacientes com e sem mutação (12 ± 6.0 e 14 ± 7.6 ng/ml, respectivamente).

4.2.4.2 Análise das concentrações basais de IGF-1 e IGFBP-3 nos pacientes com SN com e sem mutação nos genes estudados

As concentrações basais de IGF-1 e IGFBP-3 foram obtidas em 84 (55%) e 76 (50%) pacientes, respectivamente. A média do escore-Z das concentrações basais de IGF-1 foi de -1.0 ± 1.3 . Não foram encontradas diferenças entre os pacientes com e sem mutação em relação às concentrações basais de IGF-1 (-0.9 ± 1.3 vs -1.4 ± 1.3 ; $p = 0.2$). A média do escore-Z das concentrações basais de IGFBP-3 foi de -0.7 ± 1.0 . Não foram encontradas diferenças entre os pacientes com e sem mutação em relação às concentrações basais de IGFBP-3 (-0.7 ± 1.0 vs -0.7 ± 1.0 ; $p = 0.8$).

Na avaliação da correlação genótipo-fenótipo, não foram encontradas diferenças Z-IGF-1 e Z-IGFBP-3 entre os pacientes com mutações nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*.

5 DISCUSSÃO

A síndrome de Noonan constitui uma das mais frequentes síndromes genéticas com herança mendeliana. Além da sua importância para cardiologistas e geneticistas, pacientes com SN são frequentemente avaliados por endocrinologistas devido a distúrbio de crescimento, atraso puberal e/ou criptorquidia. Até o momento, mutações nos genes *PTPN11*, *KRAS*, *SOS1*, *RAF1*, *MEK1*, *BRAF*, *NRAS*, *SHOC-2* e *CBL* ^(20, 24-34) foram descritas na SN, numa frequência em torno de 75%⁽⁷⁶⁾. Isso representa uma grande heterogeneidade genética que se expressa em um fenótipo bastante variável.

No presente estudo, avaliamos a frequência de mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS* em uma grande casuística de pacientes com SN e posteriormente avaliamos os padrões de crescimento dos pacientes com mutação identificada. A nossa casuística preencheu os critérios diagnósticos propostos para a SN ⁽⁵⁾ e amplamente utilizados na literatura. Algumas características clínicas importantes para o diagnóstico da SN, como deformidade torácica, cardiopatia congênita e baixa estatura, foram observadas com frequência semelhante à observada em estudos prévios ⁽⁸⁻¹⁰⁾, reforçando a adequação do diagnóstico clínico.

No total, mutações nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS* foram encontradas em 99 pacientes (65%) do nosso estudo. Isoladamente, cada gene contribuiu com uma frequência de participação semelhante à descrita

na literatura, com predominância de mutações no gene *PTPN11* (47%). As mutações encontradas neste gene agruparam-se principalmente nos éxons 3, 8 e 13. O estudo destes 3 éxons permitiu identificar mutações em 43% dos pacientes analisados. Além disso, o códon 308 pode ser considerado *hot spot* na nossa casuística, uma vez que abrangeu 31% das mutações no *PTPN11* (p.N308D, p.N308S e p.N308T). As mutações encontradas no gene *PTPN11* em nosso estudo já foram anteriormente descritas e predizem um aumento da atividade tirosina fosfatase da SHP-2.

As mutações encontradas no gene *SOS1* comprometeram resíduos localizados na ligação entre domínios DH-PH (Asn190, The266 e Met269), na hélice de ligação (Arg552) e no domínio CDC25 (Lys728 e Glu846). Essas alterações desregulam a auto-inibição da atividade da proteína *SOS1*, aumentando sua capacidade de ativar a proteína RAS ⁽²⁵⁾, ou seja, também resultando em ganho de função dessa proteína. Os éxons 6 e 10 concentraram 77% das mutações encontradas no gene *SOS1*, o que equivale a 7% da casuística total.

As mutações do gene *RAF1* encontradas na nossa casuística concentraram-se exclusivamente no éxon 7, onde está localizada a Ser259, importante para a ligação da proteína 14-3-3 e manutenção da proteína *RAF1* na sua conformação inativa. A sequência de reconhecimento consenso da proteína 14-3-3 é RSXpSXP e mutações nos resíduos correspondentes (Arg256, Ser 257, Ser259 e Pro261) já foram descritos na literatura ^(28, 29). A mutação p.S257L esteve presente em 7/10 pacientes com mutação no gene *RAF1*. Essa mutação também foi associada à presença de

miocardiopatia hipertrófica em estudos anteriores ^(28, 29, 58) assim como na presente casuística.

A mutação mais frequente no gene *KRAS* foi a mutação p.V14I, correspondendo a 60% das mutações encontradas neste gene. Esta mutação já foi descrita como somática em alguns tipos de câncer, inclusive leucemia mieloide aguda ⁽⁷⁷⁾. Estudos funcionais desta mutação mostraram diminuição da atividade GTPase intrínseca da proteína *KRAS* comparada com a proteína *wild-type*, resultando em uma redução da inativação da proteína e aumento da transdução do sinal via MAPK ⁽⁷⁸⁾.

Mutações somáticas envolvendo os genes *PTPN11*, *KRAS* e *RAF1* são frequentemente relacionadas ao câncer, ao contrário das mutações no gene *SOS1*. Entretanto, ainda não há uma estimativa do risco total de câncer em pacientes com SN. Doenças mieloproliferativas e leucemias ocorrem em aproximadamente 50% dos pacientes com SN ⁽⁷⁹⁾. Tumores sólidos também são descritos, especialmente rabdomiossarcomas, neuroblastoma e lesões múltiplas de células gigantes (LMCG) da mandíbula ⁽⁸⁰⁾.

A mutação p.T73I do gene *PTPN11* e a mutação p.V14I no gene *KRAS* são descritas em pacientes portadores de SN que apresentam leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) ^(24, 79). As mutações p.M269T e p.R552G do gene *SOS1* foram descritas recentemente em 2 pacientes com SN que apresentaram tumor de células de Sertoli e tumor de células granulares ⁽⁸⁰⁾, respectivamente. Nenhum paciente da presente casuística apresentou a ocorrência de neoplasia maligna. Porém, 2 pacientes carreando mutações no gene *PTPN11* (p.N308S e p.Q510P) apresentaram

LMCG da mandíbula, sendo um deles descrito em relato anterior ⁽⁸¹⁾. Isso reforça a importância do acompanhamento desses pacientes no que concerne ao risco de desenvolvimento de tumores.

A análise da distribuição das mutações em nossa casuística, permite propor uma melhor estratégia para o estudo molecular de pacientes com SN, iniciando o estudo pelos éxons 3, 8 e 13 do *PTPN11*, seguido dos éxons 6 e 10 do *SOS1* e éxon 7 do *RAF1* nos pacientes sem miocardiopatia hipertrófica. Já nos pacientes com miocardiopatia hipertrófica, o estudo deve ser iniciado pelo éxon 7 do *RAF1*, seguindo o estudo pelas regiões *hotspot* do *PTPN11* e *SOS1*. Com esta estratégia identificamos 86% das mutações (intervalo de confiança: 79-93%) referidas em nosso estudo através da análise de apenas 6 éxons, tornando mais eficiente a avaliação molecular destes pacientes. O estudo dos éxons remanescentes estaria reservado para os pacientes sem mutações identificadas.

Os estudos que avaliaram o crescimento na SN foram elaborados previamente ao conhecimento do diagnóstico molecular. É sabido que o diagnóstico clínico da SN pode ser muito difícil, particularmente em pacientes com formas leves ⁽¹⁰⁾. Além disso, uma mudança acentuada do fenótipo com a idade tem sido bem documentada, resultando em um fenótipo sutil em pacientes adultos ⁽⁴⁾. Essas dificuldades podem ter colaborado para a inclusão de pacientes com fenótipo mais típico nas coortes anteriores. Nesse contexto, para avaliação do crescimento de pacientes com SN, incluímos apenas pacientes com diagnóstico molecular confirmado, independentemente da gravidade da manifestação clínica. Esta

abordagem permitiu uma representação adequada do amplo espectro fenotípico dos pacientes com SN.

Em termos de crescimento pré-natal, nossos resultados foram semelhantes aos descritos anteriormente na literatura ^(8, 10), mostrando que pacientes com SN apresentaram crescimento pré-natal preservado. No entanto, a nossa frequência de prematuridade (15%) foi superior à média relatada para os padrões brasileiros (6,5%) ⁽⁸²⁾. É frequente o relato de polidramnio na SN, o que poderia ser a causa da prematuridade na nossa casuística, porém os dados referentes às condições de nascimento não estavam disponíveis na maioria dos casos para confirmar esta hipótese.

O comprometimento do crescimento pós-natal iniciou-se já a partir do primeiro ano de vida, acentuando-se na puberdade. A altura final atingida foi menor do que a média da população normal brasileira, correspondendo a um Z-altura de -2,3 e -2,2 para o sexo masculino e feminino, respectivamente ⁽⁷³⁾. O comprometimento do crescimento foi semelhante ao observado na coorte da Alemanha (Z-altura final de -2,5 para homens e -2,2 para mulheres) ⁽¹⁵⁾ e da América do Norte (Z-altura de -2,4 e -2,2 para o sexo masculino para o feminino, respectivamente) ⁽⁶¹⁾.

A causa da baixa estatura pós-natal na SN permanece não esclarecida. A proteína SHP-2 regula negativamente a sinalização via JAK/STAT5 através da desfosforilação dos resíduos Tyr487 e Tyr595 (principalmente) do receptor de GH ⁽⁸³⁾. Em consequência, as baixas concentrações de IGF-1 sugerem resistência parcial ao hormônio de crescimento nos pacientes com mutação no *PTPN11* ^(21, 63, 65). Entretanto,

ainda não há uma hipótese para explicar o mecanismo da baixa estatura nos pacientes com mutação nos outros genes da via RAS/MAPK.

A secreção de GH é normal nos pacientes com SN. Corroborando essa afirmação, nenhum paciente da nossa casuística foi considerado deficiente pra secreção de GH após teste farmacológico. Em contraste, as concentrações de IGF-1 observadas nos pacientes com SN corresponderam a -1 desvio-padrão da média da população normal, semelhante ao relatado na literatura ^(21, 63, 65). O Z-IGF-1 foi semelhante entre os genótipos, assim como, o Z-IGFBP-3. Entretanto, o número de pacientes avaliados em cada genótipo foi pequeno, devendo esse resultado negativo ser analisado com cautela.

A avaliação da correlação genótipo-fenótipo mostrou que o crescimento pós-natal foi mais comprometido nos pacientes que carregam mutações no gene *RAF1* em relação ao pacientes com mutação nos genes *PTPN11* e *SOS1*. Essa observação já foi corroborada na literatura em trabalhos recentes que avaliaram a correlação genótipo-fenótipo na SN ^(58, 84). A razão para que mutações comprometendo a mesma via de sinalização resultem em fenótipos distintos ainda permanece não esclarecida.

A via RAS/MAPK traduz o sinal gerado por fatores de crescimento da superfície celular ao núcleo e, dependendo da célula em questão, participa de diversas funções biológicas como crescimento celular, sobrevivência e diferenciação. Apesar de o sinal ser passado de proteína para proteína, muitas moléculas estão envolvidas neste processo e cada uma desempenha uma função diferente ⁽⁸⁵⁾. Além disso, diversos hormônios utilizam a via

RAS/MAPK no processo de crescimento, principalmente na placa epifisária onde IGF-1 e FGFs (*fibroblast growth factors*) apresentam papel fundamental no crescimento linear.

Nesse sentido, para tentar entender a variabilidade fenotípica dos pacientes com SN, investigamos se a atividade tirosina-fosfatase das mutações encontradas no gene *PTPN11* poderia exercer influência no fenótipo dos pacientes. Parece coerente que mutações com maior atividade tirosina-fosfatase tenham maior efeito deletério em relação ao fenótipo relacionado com crescimento por interferir mais com a sinalização do GH. Entretanto, não foi possível correlacionar a atividade tirosina-fosfatase com a frequência e intensidade da baixa estatura.

Outra possibilidade aventada foi se a presença de polimorfismos em outros genes da via de sinalização RAS/MAPK poderia modular o fenótipo de pacientes com mutação no gene *PTPN11*. Estudamos os polimorfismos do *KRAS* devido à frequência encontrada na nossa casuística. Até onde é do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar a influência de polimorfismos do *KRAS* no fenótipo de pacientes com mutação no gene *PTPN11*. Não encontramos correlação entre os polimorfismos do gene *KRAS* e a frequência e o tipo de cardiopatia e a frequência e intensidade da baixa estatura nos pacientes com SN.

Ainda em relação à correlação genótipo-fenótipo, avaliamos a recorrência de 2 mutações distintas: p.N308D no gene *PTPN11* e p.S257L no gene *RAF1*. É interessante notar que o fenótipo observado nos pacientes com a mutação p.N308D é distinto do observado nos pacientes com a

mutação p.S257L, tanto em relação ao tipo de cardiopatia e à intensidade da baixa estatura. Essa observação reforça a nossa sugestão de pesquisar o gene *RAF1* em pacientes com miocardiopatia hipertrófica e o gene *PTPN11* nos pacientes com EVP.

O presente estudo foi o primeiro que avaliou o IMC dos pacientes com SN. Na nossa casuística, o Z-IMC observado em pacientes com SN adultos foi mais baixo quando comparado ao padrão brasileiro, em ambos os sexos ⁽⁷³⁾. Observando a curva derivada no nosso estudo para o IMC x Idade, não é possível notar o *catch-up*, normalmente observado em torno dos 6-7 anos de idade na curva de referência da população normal ⁽⁷⁴⁾. Além disso, o IMC dos pacientes com SN caiu em torno de 1 desvio-padrão da média após os 8 anos de idade e se manteve assim até a idade adulta.

É importante ressaltar que o IGF-1 também pode ser utilizado como marcador nutricional ⁽⁸⁶⁾. Os achados referentes ao IMC juntamente com as baixas concentrações de IGF-1 observados na nossa casuística levantam a possibilidade de que mutações associadas com a SN possam ter influência no metabolismo e no controle do balanço energético. Assim com o IGF-1, a insulina e a leptina exercem suas funções através de receptores tirosina-quinase ^(87, 88). O aumento da transdução do sinal via RAS/MAPK presente nas mutações relacionadas à SN pode alterar as ações da insulina e da leptina, perturbando o controle da saciedade. O perfil metabólico dos pacientes com SN ainda não foi pesquisado, sendo de grande interesse caracterizar o metabolismo dos pacientes com SN para melhor esclarecer esses achados.

Gráficos de crescimento específicos para síndromes genéticas já foram descritos previamente e são um importante instrumento para compreender o curso natural do crescimento nos pacientes afetados ⁽⁸⁹⁻⁹²⁾. Em razão disso, os gráficos para Altura x Idade e IMC x Idade derivados dos nossos resultados traduzem o comportamento do crescimento natural da SN e permitem o adequado acompanhamento desses indivíduos a fim de identificar aqueles que necessitam de ações específicas.

Acreditamos que a variabilidade fenotípica presente nessa síndrome esteja diretamente ligada aos diferentes papéis exercidos pelas proteínas que participam da via RAS/MAPK, sendo o aumento da transdução do sinal o resultado comum. Na última década, muito se avançou em direção à compreensão dos efeitos das mutações causadoras da SN sobre essa importante via de sinalização. Entretanto, mais estudos em relação à via RAS/MAPK serão necessários para esclarecer as questões relacionadas ao crescimento e outras características fenotípicas da SN.

6 CONCLUSÕES

-
- Mutações missense em heterozigose nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS* são identificados em 65% (intervalo de confiança: 57 – 73%) dos pacientes com síndrome de Noonan.
 - O estudo dos éxons 3, 8 e 13 do *PTPN11*, éxons 6 e 10 do *SOS1* e éxon 7 do *RAF1* permitem estabelecer o diagnóstico molecular em 86% (intervalo de confiança: 79-93%) dos pacientes com síndrome de Noonan.
 - Os pacientes com SN e mutação no gene *RAF1* apresentam maior frequência de miocardiopatia hipertrófica enquanto pacientes com mutações no *PTPN11* ou *SOS1* apresentam maior frequência de estenose de valva pulmonar.
 - A variabilidade fenotípica observada nos pacientes com mutação no *PTPN11* não pode ser explicada pelo grau que estas mutações influenciam a atividade tirosina fosfatase da SHP-2 nem pela presença de polimorfismos no gene *KRAS*.
 - Foram construídas curvas de referência para Altura e Índice de Massa Corpórea para idade e sexo específicas para pacientes com síndrome de Noonan.
-

-
- O crescimento pré-natal é preservado na SN com comprometimento da altura já no primeiro ano de vida.
 - Pacientes com mutação no gene *SOS1* apresentam menor prejuízo do crescimento pós-natal em relação aos pacientes com mutações nos genes *PTPN11* e *RAF1*.
 - O IMC dos pacientes com mutação nos genes causadores da SN está aproximadamente -1 desvio-padrão abaixo da média da população normal.
 - Pacientes com mutação no gene *RAF1* apresentam menor comprometimento do IMC em relação aos pacientes com mutações nos genes *PTPN11* e *SOS1*.
-

7 ANEXOS

Anexo A: Pares de *primers* dos genes estudados

1- Pares de *primers* para amplificação do *PTPN11*

Éxon	Primer Sense	Primer Anti-sense	Anelamento
1	AGGGGACGAGGAGGGAAC	GGGCAGCTGCACAGTCTC	67°C
2	ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG	CAGCAAGCTATCCAAGCATGGT	60°C
3	CGACGTGGAAGATGAGATCTGA	CACGTACCAAGTATATGCAGGAATG	60°C
4	GATTGATCAATCCCTTGGAGGAATG	GTCACCAGACCCAACGTGGTG	60°C
5	CTGCAGTGAACATGAGAGTGCTTG	GTTGAAGCTGCAATGGGTACATG	60°C
6	TGCATTAACACCGTTTTCTGT	GTCAGTTTCAAGTCTCTCAGGTC	54°C
7	GAACATTTCTCAGGATGAATTCC	GGTACAGAGGTGCTAGGAATCA	56°C
8 e 9	TGGACTAGGCTGGGGAGTAA	TCAAATTTCTCCTAGTCCCTTTTT	56°C
10	GCAAGACTTGAACATTTGTTTGTTC	GACCCTGAATTCCTACACACCATC	60°C
11	CAAAAGGAGACGAGTTCTGGGAAC	GCAGTTGCTCTATGCCTCAAACAG	60°C
12	GTCCCAAAGAGTAGACATTGTTTC	GACTGTTTTCTGAGCACTTTC	56°C
13	CAACACTGTAGCCATTGCAACA	CGTATCCAAGAGGCCTAGCAAG	60°C
14	ACCATTGTCCCTCACATGTGC	CAGTGAAAGGCATGTGCTACAAAC	60°C
15	CAGGTCCTAGGCACAGGAACTG	ACATTCCTCAAATTGCTTGCCCT	60°C

2- Pares de *primers* para amplificação do *RAF1*

Éxon	Primer Sense	Primer Anti-sense	Anelamento
2	TGTATTGTGTTCTTGGGTTGAA	TAATGTGCTCCACAGGCAGA	60°C
3	ATTTCTGTGCCACCTTTCC	CATAGCTATTTGAAGCTAGAAGATCC	60°C
4	TGTTATTTCTATTGAACTTTGATCTTG	CATACGCATATTACCTGAGAAATC	60°C
5	TTTTTGAGGCCAAGAAATG	TCCAGACCTGTCAGTCAAAATC	60°C
6	CAAGGCATGCTGATTGTCTC	GGAGGGAATGCGAAGAACT	60°C
7	CAAATATGTACTTGAAAGACTTCACCA	AAAACCTCTGAAATAAGTATCAACCTC	60°C
8 e 9	TTTTTCCCTCCCCCAGAG	AATTTCCAACGAGTTTTTCTT	60°C
10	AGACAAAAATTGGAAGTATGGTTAAT	CAGGTATAATCAAGTATGTAAGGGAGA	60°C
11	TCCTCAAACTAGGTTATTTGAAAGAC	GCGGCACAGTCCACTAACTC	60°C
12	CGACAGCACAGAACCCACT	CCAGAGGCTTGTGCAAAGAT	60°C
13	CAGGCCTTCAGTGGCTTTAC	AAAGCCTCCCTTCTGTTTCC	60°C
14	TGACCATTCTTTTGAAACCAGA	AGGCATTCTTTTGCCCTAT	60°C
15 e 16	ATGTGGGGACTGAAGAATGG	CTCCACCTTATATTGCCATC	60°C
17	TGAGACACAGCTAATGAGAGCA	CTGCTGGCTTCTCCTCCTC	60°C

3- Pares de primers para amplificação do *KRAS*

Éxon	Primer Sense	Primer Anti-sense	Anelamento
2	GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA	GAATGGTCCTGCACCAGTAA	61.8°C
3	TCAAGTCCTTTGCCCATTTT	TGCATGGCATTAGCAAAGAC	61.8°C
4	TTGTGGACAGGTTTGAAGA	AGAAGCAATGCCCTCCTAAG	61.8°C
5	CTCAAGCTCATAATCTCAAACCTCT	GTAATTCTAAAGTGGTTGCCACC	61.8°C
6	GACAAAACACCTATGCGGATGA	GTCAACAGTCTGCATGGAGCA	61.8°C

4- Pares de primers para amplificação do *SOS1*

Éxon	Primer Sense	Primer Anti-sense	Anelamento
1	CTGTTCCGCGCTGCGAGC	CGAGACCGGGAAGAAAGACG	67.3°C
2	TGCCCCGGCCACAAACCCAC	CCCTGTTCACTGACATTACAACC	61.8°C
3	CAGGATGTGATATTCCCCCTAG	CCTTCTCACCACATAAATCTCTGG	61.8°C
4	GTTGGTAAGCACAGGCCTC	CTGGAGATATTCCCCAACAC	61.8°C
5	CAGAGAACTTAGAGCATTTTAC	GTGATCATGAATTAAGTCCAC	61.8°C
6	TGCAAATTGTACACCTTTGCAG	AGCTGGAAAGAAGTAAGACTC	61.8°C
7 e 8	TGTGCTCGCATAGTCGTGCC	CACTAATGTGCAGGGTACTCAC	46.7°C
9	GCCTGTCAAGATATAACCC	GAGGGAAGTGGGATCCCTG	64°C
10	CATGAGCTCTAGTTTTCTGTCA	CACAATAAACCCATGCAGGA	61.8°C
11	GTCCAAAGCCTTCTACTTGGC	GAAAAGGATCTTAGCTCAATCTC	50.5°C
12	GACTGGTGAAAACGTTTGTGG	CTCCTTGTGGGAAAGGTCC	56.7°C
13	CAAACAAGGAGAGGGGTGAC	TACTGAGCCCCAATGACATC	56.7°C
14	TCAGGTGTCATCCGTGTGAC	AACCCTATAAGGCAGAAATCAG	61.8°C
15	GTTTTACAGACCTTTCTGTTGG	GACAGAGCAAACTCCGTCTC	59.6°C
16	TTATACTATCGCCACCCCCCTA	CTACTGAAAAGACAAATGAG	54°C
17	GGGCGTTTCTGTTAGCCTAG	TTCTAAAGGGCTTCAGGTGC	59.6°C
18	GGCAACTGAGATGGTACAGTG	CTCCCCTATAAAATAAACCTGCC	59.6°C
19	GGCAGGTTTATTTTATAGGGGAG	GGAAGTGGGATATTCCTGGAC	56.7°C
20a	TAGCTGAATTTTACCAGGCAC	CTGTGGTACTGGAAGCACCAG	56.7°C
20b	CCACACCTCTGCAGCAGGAG	GTTGGTGGAGTTTAGAATTTGTC	56.7°C
21	CTTCTCAAAAGTAAGTAGTAA	GTACCAATGCTGCCAGACCC	53.4°C
22	GTCTGCATGCTTTTATGGCAG	GAGAACTAACTAGACAGCCG	61.8°C
23a	TAGCATCCTGCCAATAGCATG	GTGCCGTGAGGAGAAGGTG	61.8°C
23b	CCACCACGAGAACCTGTGAG	GCTGGCACATTCAGTGCATCC	61.8°C

Anexo B: Valores de percentil para altura e IMC em relação à idade no sexo masculino e feminino

Altura x Idade: sexo masculino

Idade anos	Percentil						
	P3%	P10%	P25%	P50%	P75%	P90%	P97%
0.0	45.0	46.2	47.6	49.2	51.0	52.6	54.4
0.3	49.0	50.4	51.9	53.7	55.6	57.4	59.4
0.5	52.9	54.4	56.1	58.0	60.1	62.1	64.2
0.8	56.7	58.3	60.1	62.2	64.4	66.5	68.8
1.0	60.2	61.9	63.8	66.0	68.4	70.7	73.2
1.3	63.4	65.3	67.2	69.6	72.1	74.6	77.2
1.5	66.3	68.2	70.3	72.8	75.5	78.1	80.8
1.8	68.9	70.9	73.1	75.7	78.5	81.2	84.0
2	71.2	73.3	75.6	78.3	81.2	84.0	87.0
3	78.5	80.9	83.4	86.4	89.7	92.9	96.2
4	84.2	86.7	89.5	92.8	96.4	99.9	103.6
5	88.9	91.7	94.7	98.3	102.1	105.8	109.8
6	93.5	96.4	99.6	103.4	107.5	111.5	115.7
7	98.4	101.5	104.9	108.9	113.3	117.6	122.1
8	102.9	106.2	109.8	114.0	118.6	123.1	127.9
9	106.8	110.2	113.9	118.3	123.1	127.8	132.8
10	110.4	113.9	117.8	122.4	127.4	132.2	137.4
11	114.1	117.7	121.7	126.5	131.6	136.6	142.0
12	117.7	121.4	125.5	130.4	135.8	140.9	146.5
13	121.0	124.9	129.1	134.1	139.5	144.9	150.5
14	124.6	128.6	132.9	138.1	143.7	149.1	154.9
15	129.0	133.1	137.5	142.9	148.6	154.2	160.2
16	133.1	137.3	141.9	147.3	153.2	159.0	165.1
17	136.1	140.4	145.0	150.5	156.5	162.3	168.5
18	138.5	142.8	147.5	153.1	159.1	165.0	171.2
19	140.8	145.1	149.9	155.5	161.5	167.4	173.7
20	143.1	147.5	152.2	157.8	163.9	169.8	176.1

Altura X Idade: sexo feminino

Idade anos	Percentil						
	P3%	P10%	P25%	P50%	P75%	P90%	P97%
0.0	42.7	44.8	46.5	48.0	49.3	49.8	51.1
0.3	47.0	49.2	51.0	52.7	54.1	54.7	56.1
0.5	51.2	53.5	55.5	57.2	58.8	59.4	61.0
0.8	54.6	57.0	59.0	60.9	62.6	63.3	65.0
1.0	58.5	61.0	63.1	65.2	66.9	67.7	69.6
1.3	61.5	64.1	66.3	68.5	70.3	71.1	73.2
1.5	64.9	67.6	69.9	72.1	74.1	75.0	77.2
1.8	67.5	70.2	72.6	74.9	76.9	77.9	80.2
2	70.2	72.9	75.4	77.8	79.9	80.9	83.4
3	77.3	80.1	82.7	85.4	87.8	88.9	91.8
4	82.7	85.6	88.3	91.1	93.8	95.0	98.2
5	87.9	90.8	93.6	96.6	99.5	100.9	104.4
6	93.2	96.2	99.2	102.4	105.5	107.0	110.9
7	98.3	101.5	104.7	108.2	111.5	113.1	117.3
8	102.4	105.9	109.3	112.9	116.4	118.1	122.5
9	106.2	109.9	113.5	117.4	121.1	122.8	127.4
10	109.8	113.8	117.7	121.8	125.6	127.5	132.2
11	113.2	117.6	121.7	126.0	130.1	131.9	136.8
12	116.7	121.4	125.7	130.3	134.5	136.4	141.5
13	120.4	125.4	130.0	134.7	139.1	141.1	146.3
14	123.8	129.0	133.8	138.7	143.2	145.3	150.6
15	126.9	132.2	137.1	142.2	146.8	149.0	154.4
16	129.1	134.5	139.5	144.7	149.4	151.6	157.1
17	130.6	136.1	141.2	146.4	151.2	153.4	158.9
18	131.8	137.5	142.7	147.9	152.7	154.9	160.4

IMC x Idade: sexo masculino

Idade anos	Percentil						
	P3%	P10%	P25%	P50%	P75%	P90%	P97%
0	10.7	12.2	13.4	14.5	15.5	16.3	17
0.3	12.8	13.8	14.7	15.8	16.7	17.6	18.4
0.5	13.5	14.4	15.3	16.3	17.3	18.2	19.1
1	13.9	14.8	15.6	16.6	17.5	18.4	19.3
1.5	13.8	14.5	15.3	16.2	17.2	18	18.9
2	13.6	14.3	15.1	15.9	16.8	17.7	18.5
3	13.6	14.2	15	15.8	16.7	17.5	18.3
4	13.5	14.2	14.9	15.7	16.5	17.4	18.2
5	13.5	14.1	14.8	15.6	16.5	17.3	18.2
6	13.5	14.1	14.8	15.6	16.5	17.3	18.2
7	13.5	14.1	14.8	15.6	16.5	17.4	18.3
8	13.5	14.1	14.8	15.7	16.6	17.5	18.5
9	13.6	14.2	14.9	15.8	16.7	17.6	18.7
10	13.7	14.3	15	15.9	16.9	17.9	18.9
11	13.9	14.5	15.2	16.1	17.1	18.1	19.2
12	14.1	14.7	15.5	16.4	17.4	18.5	19.6
13	14.3	15	15.8	16.7	17.8	18.9	20.1
14	14.6	15.3	16.1	17.1	18.2	19.3	20.6
15	14.9	15.6	16.5	17.5	18.6	19.8	21.1
16	15.2	16	16.8	17.9	19.1	20.3	21.7
17	15.6	16.4	17.2	18.3	19.5	20.8	22.3
18	16	16.7	17.6	18.7	20	21.4	22.9
19	16.3	17.1	18	19.2	20.5	21.9	23.6
20	16.7	17.5	18.4	19.6	21	22.5	24.2

IMC x Idade: sexo feminino

Idade anos	Percentil						
	P3%	P10%	P25%	P50%	P75%	P90%	P97%
0	9.7	11	12.4	14	15.7	16.5	18.8
0.3	10.8	11.9	13.2	14.7	16.4	17.3	19.9
0.5	11.5	12.5	13.6	15.1	16.8	17.7	20.6
1	13	13.8	14.8	16.1	17.8	18.8	22.4
1.5	13.2	13.9	14.9	16.2	17.8	18.8	22.5
2	13.2	14	14.9	16.1	17.8	18.8	22.6
3	13.2	13.9	14.8	16	17.6	18.6	22.4
4	13	13.6	14.5	15.6	17.1	18.1	21.9
5	12.7	13.3	14.1	15.2	16.6	17.5	21.3
6	12.4	13	13.8	14.8	16.2	17.1	20.8
7	12.3	12.8	13.6	14.6	15.9	16.8	20.5
8	12.2	12.8	13.5	14.5	15.8	16.7	20.4
9	12.3	12.9	13.6	14.6	15.9	16.8	20.5
10	12.5	13.1	13.8	14.8	16.1	17	20.8
11	12.9	13.4	14.1	15.1	16.5	17.4	21.3
12	13.2	13.8	14.5	15.5	16.9	17.8	21.9
13	13.7	14.3	15	16.1	17.5	18.4	22.6
14	14.2	14.8	15.6	16.6	18.1	19	23.4
15	14.7	15.3	16.1	17.2	18.7	19.7	24.2
16	15.2	15.9	16.7	17.8	19.4	20.4	25
17	15.8	16.4	17.2	18.4	20	21	25.8
18	16.3	17	17.8	19	20.6	21.7	26.6

Anexo C: Curvas de crescimento construídas para SN

Curva de crescimento específica para SN: altura x idade no sexo masculino

Curva de crescimento específica para SN: altura x idade no sexo feminino

Curva de crescimento específica para SN: IMC x idade no sexo masculino

Curva de crescimento específica para SN: IMC x idade no sexo feminino

Anexo D: Curvas de crescimento para SN construídas por Ranke *et. al.* ⁽¹⁵⁾ (verde) sobreposta à curva de crescimento construída para SN no presente estudo nos sexos masculino (azul) e feminino (rosa)

Curva Altura x Idade no sexo masculino

Curva de Altura x Idade no sexo feminino

8 REFERÊNCIAS

1. Noonan JAE. Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease. *J Pediatr*. 1963;63:468.
 2. Nora JJ, Nora AH, Sinha AK, Spangler RD, Lubs HA. The Ullrich-Noonan syndrome (Turner phenotype). *Am J Dis Child*. 1974;127(1):48-55.
 3. 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.
 4. Allanson JE, Hall JG, Hughes HE, Preus M, Witt RD. Noonan syndrome: the changing phenotype. *Am J Med Genet*. 1985 Jul;21(3):507-14.
 5. 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 Noonan syndrome. *Am J Med Genet*. 1994;53(2):187-91.
 6. Zenker M, Buheitel G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W, et al. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr*. 2004 Mar;144(3):368-74.
 7. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):295-308.
 8. Allanson JE. Noonan syndrome. *J Med Genet*. 1987 Jan;24(1):9-13.
 9. Duncan WJ, Fowler RS, Farkas LG, Ross RB, Wright AW, Bloom KR, et al. A comprehensive scoring system for evaluating Noonan syndrome. *Am J Med Genet*. 1981;10(1):37-50.
-

-
10. Mendez HM, Opitz JM. Noonan syndrome: a review. *Am J Med Genet.* 1985;21(3):493-506.
 11. Noonan JA. Noonan syndrome and related disorders: alterations in growth and puberty. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006 Dec;7(4):251-5.
 12. Weismann CG, Gelb BD. The genetics of congenital heart disease: a review of recent developments. *Curr Opin Cardiol.* 2007 May;22(3):200-6.
 13. Raaijmakers R, Noordam C, Noonan JA, Croonen EA, van der Burgt CJ, Draaisma JM. Are ECG abnormalities in Noonan syndrome characteristic for the syndrome? *Eur J Pediatr.* 2008 Dec;167(12):1363-7.
 14. Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, et al. Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics.* 2010 Oct;126(4):746-59.
 15. Ranke MB, Heidemann P, Knupfer C, Enders H, Schmaltz AA, Bierich JR. Noonan syndrome: growth and clinical manifestations in 144 cases. *Eur J Pediatr.* 1988 Dec;148(3):220-7.
 16. Noonan JA, Raaijmakers R, Hall BD. Adult height in Noonan syndrome. *Am J Med Genet A.* 2003 Nov 15;123(1):68-71.
 17. Sharland M, Morgan M, Smith G, Burch M, Patton MA. Genetic counselling in Noonan syndrome. *Am J Med Genet.* 1993 Feb 15;45(4):437-40.
 18. Jamieson CR, van der Burgt I, Brady AF, van Reen M, Elswawi MM, Hol F, et al. Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12. *Nat Genet.* 1994;8(4):357-60.
-

-
19. Legius E, Schollen E, Matthijs G, Fryns JP. Fine mapping of Noonan/cardio-facio cutaneous syndrome in a large family. *Eur J Hum Genet.* 1998 Jan;6(1):32-7.
 20. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2001;29(4):465-8.
 21. Ferreira LV, Souza SA, Arnhold IJ, Mendonca BB, Jorge AA. PTPN11 (protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11) mutations and response to growth hormone therapy in children with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Sep;90(9):5156-60.
 22. Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillesen-Kaesbach G, et al. 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.
 23. Sarkozy A, Conti E, Seripa D, Digilio MC, Grifone N, Tandoi C, et al. Correlation between PTPN11 gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. *J Med Genet.* 2003 Sep;40(9):704-8.
 24. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2006 Mar;38(3):331-6.
 25. Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007 Jan;39(1):70-4.
-

-
26. Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007 Jan;39(1):75-9.
 27. Zenker M, Horn D, Wieczorek D, Allanson J, Pauli S, van der Burgt I, et al. 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.
 28. Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2007 Aug;39(8):1007-12.
 29. Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007 Aug;39(8):1013-7.
 30. Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, et al. Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet.* 2007 Dec;44(12):763-71.
 31. Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, et al. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat.* 2009 Apr;30(4):695-702.
 32. Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C, Horn D, et al. A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2010 Jan;42(1):27-9.
-

-
33. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet.* 2009 Sep;41(9):1022-6.
 34. Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet.* 2010 Aug 13;87(2):250-7.
 35. Ahmad S, Banville D, Zhao Z, Fischer EH, Shen SH. A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 15;90(6):2197-201.
 36. Feng GS. Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res.* 1999 Nov 25;253(1):47-54.
 37. Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci.* 2003 Jun;28(6):284-93.
 38. Stein-Gerlach M, Wallasch C, Ullrich A. SHP-2, SH2-containing protein tyrosine phosphatase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 May;30(5):559-66.
 39. Van Vactor D, O'Reilly AM, Neel BG. Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Genet Dev.* 1998 Feb;8(1):112-26.
 40. Dechert U, Duncan AM, Bastien L, Duff C, Adam M, Jirik FR. Protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 (PTPN11) is localized to 12q24.1- 24.3. *Hum Genet.* 1995;96(5):609-15.
-

-
41. Kontaridis MI, Swanson KD, David FS, Barford D, Neel BG. PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem*. 2006 Mar 10;281(10):6785-92.
 42. Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:45-68.
 43. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, Van Der Burgt I, et al. PTPN11 Mutations in Noonan Syndrome: Molecular Spectrum, Genotype- Phenotype Correlation, and Phenotypic Heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 2002;70(6):1555-63.
 44. Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, et al. Diversity and Functional Consequences of Germline and Somatic PTPN11 Mutations in Human Disease. *Am J Hum Genet*. 2006 Feb;78(2):279-90.
 45. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):459-65.
 46. Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 May;4(5):373-84.
 47. Kratz CP, Niemeyer CM, Zenker M. An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development. *J Mol Med*. 2007 Mar;85(3):227-35.
 48. Denayer E, de Ravel T, Legius E. Clinical and molecular aspects of RAS related disorders. *J Med Genet*. 2008 Nov;45(11):695-703.
 49. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat*. 2008 Aug;29(8):992-1006.
-

-
50. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A, et al. Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.* 2006 Jul;79(1):129-35.
 51. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet.* 2006 Mar;38(3):294-6.
 52. Gureasko J, Galush WJ, Boykevich S, Sondermann H, Bar-Sagi D, Groves JT, et al. Membrane-dependent signal integration by the Ras activator Son of sevenless. *Nat Struct Mol Biol.* 2008 May;15(5):452-61.
 53. Quilliam LA. New insights into the mechanisms of SOS activation. *Sci STKE.* 2007 Nov 27;2007(414):pe67.
 54. Zenker M, Voss E, Reis A. Mild variable Noonan syndrome in a family with a novel PTPN11 mutation. *Eur J Med Genet.* 2007 Jan-Feb;50(1):43-7.
 55. Shannon K, Bollag G. Sending out an SOS. *Nat Genet.* 2007 Jan;39(1):8-9.
 56. Yip-Schneider MT, Miao W, Lin A, Barnard DS, Tzivion G, Marshall MS. Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J.* 2000 Oct 1;351(Pt 1):151-9.
 57. Dhillon AS, von Kriegsheim A, Grindlay J, Kolch W. Phosphatase and feedback regulation of Raf-1 signaling. *Cell Cycle.* 2007 Jan 1;6(1):3-7.
 58. Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cave H, Verloes A, Okamoto N, et al. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat.* 2010 Mar;31(3):284-94.
-

-
59. Tartaglia M, Zampino G, Gelb BD. Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis. *Mol Syndromol*. 2010 Feb;1(1):2-26.
 60. Allanson JE, Bohring A, Dorr HG, Dufke A, Gillessen-Kaesbach G, Horn D, et al. The face of Noonan syndrome: Does phenotype predict genotype. *Am J Med Genet A*. 2010 Aug;152A(8):1960-6.
 61. Witt DR, Keena BA, Hall JG, Allanson JE. Growth curves for height in Noonan syndrome. *Clin Genet*. 1986 Sep;30(3):150-3.
 62. Westphal O. Growth hormone therapy in Noonan syndrome: growth response and characteristics. *Horm Res*. 2009 Dec;72 Suppl 2:41-5.
 63. Binder G, Neuer K, Ranke MB, Wittekindt NE. PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Sep;90(9):5377-81.
 64. Cotterill AM, McKenna WJ, Brady AF, Sharland M, Elsayi M, Yamada M, et al. The short-term effects of growth hormone therapy on height velocity and cardiac ventricular wall thickness in children with Noonan's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Jun;81(6):2291-7.
 65. Limal JM, Parfait B, Cabrol S, Bonnet D, Leheup B, Lyonnet S, et al. Noonan syndrome: relationships between genotype, growth, and growth factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jan;91(1):300-6.
 66. Noordam C, Peer PG, Francois I, De Schepper J, van den Burgt I, Otten BJ. Long-term GH treatment improves adult height in children with Noonan syndrome with and without mutations in protein tyrosine phosphatase, non-receptor-type 11. *Eur J Endocrinol*. 2008 Sep;159(3):203-8.
-

-
67. Bertola DR, editor. *Estudo do gene PTPN11 nos pacientes afetados pela síndrome de Noonan*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.
68. Ferreira LV, editor. *Estudo de gene PTPN11 em pacientes com a síndrome de Noonan e crianças com baixa estatura idiopática*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005.
69. Silva EG, Shessarenko N, Arnhold IJ, Batista MC, Estefan V, Osorio MG, et al. GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. *Horm Res*. 2003;59(5):229-33.
70. Cole TJ, Green PJ. Smoothing reference centile curves: the LMS method and penalized likelihood. *Stat Med*. 1992 Jul;11(10):1305-19.
71. Usher R, McLean F. Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr*. 1969 Jun;74(6):901-10.
72. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child*. 1966;41(219):454-71.
73. Silva DA, Pelegrini A, Petroski EL, Gaya AC. Comparison between the growth of Brazilian children and adolescents and the reference growth charts: data from a Brazilian project. *J Pediatr (Rio J)*. 2010 Mar-Apr;86(2):115-20.
74. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. *Adv Data*. 2000 Jun 8(314):1-27.
-

-
75. Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T, Ishikiriyama S, et al. Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *J Hum Genet.* 2005;50(4):192-202.
 76. Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Feb;25(1):161-79.
 77. Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, Willis SG, Eide CA, Levine RL, et al. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood.* 2009 Feb 19;113(8):1749-55.
 78. Tidyman WE, Rauen KA. Noonan, Costello and cardio-facio-cutaneous syndromes: dysregulation of the Ras-MAPK pathway. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e37.
 79. Hasle H. Malignant diseases in Noonan syndrome and related disorders. *Horm Res.* 2009 Dec;72 Suppl 2:8-14.
 80. Denayer E, Devriendt K, de Ravel T, Van Buggenhout G, Smeets E, Francois I, et al. Tumor spectrum in children with Noonan syndrome and SOS1 or RAF1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010 Mar;49(3):242-52.
 81. Bertola DR, Kim CA, Pereira AC, Mota GF, Krieger JE, Vieira IC, et al. Are Noonan syndrome and Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome distinct entities? *Am J Med Genet.* 2001 Jan 22;98(3):230-4.
 82. DATASUS/SINASC: [Informations System on Live Births] [database on the Internet]. Ministério da Saúde, Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos - SINASC. 2009 [cited 29/05/2009].
 83. Stofega MR, Herrington J, Billestrup N, Carter-Su C. Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2, and STAT5B. *Mol Endocrinol.* 2000 Sep;14(9):1338-50.
-

-
84. Ko JM, Kim JM, Kim GH, Yoo HW. PTPN11, SOS1, KRAS, and RAF1 gene analysis, and genotype-phenotype correlation in Korean patients with Noonan syndrome. *J Hum Genet.* 2008;53(11-12):999-1006.
 85. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Nov;5(11):875-85.
 86. Binoux M. The IGF system in metabolism regulation. *Diabete Metab.* 1995 Dec;21(5):330-7.
 87. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care.* 2001 Mar;24(3):588-97.
 88. Schwartz MW, Seeley RJ. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *N Engl J Med.* 1997 Jun 19;336(25):1802-11.
 89. Horton WA, Rotter JI, Rimoin DL, Scott CI, Hall JG. Standard growth curves for achondroplasia. *J Pediatr.* 1978 Sep;93(3):435-8.
 90. Ranke MB, Pfluger H, Rosendahl W, Stubbe P, Enders H, Bierich JR, et al. Turner syndrome: spontaneous growth in 150 cases and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 1983 Dec;141(2):81-8.
 91. Styles ME, Cole TJ, Dennis J, Preece MA. New cross sectional stature, weight, and head circumference references for Down's syndrome in the UK and Republic of Ireland. *Arch Dis Child.* 2002 Aug;87(2):104-8.
 92. Wollmann HA, Schultz U, Grauer ML, Ranke MB. Reference values for height and weight in Prader-Willi syndrome based on 315 patients. *Eur J Pediatr.* 1998 Aug;157(8):634-42.
-

Apêndices

Apêndice 1: Artigo do Hormone Research

HORMONE
RESEARCH

Mini Review

Horm Res 2009;71:185–193
DOI: 10.1159/000201106

Received: August 13, 2008
Accepted: October 30, 2008
Published online: March 4, 2009

Noonan Syndrome and Related Disorders: A Review of Clinical Features and Mutations in Genes of the RAS/MAPK Pathway

Alexander A.L. Jorge · Alexsandra C. Malaquias · Ivo J.P. Arnhold
Berenice B. Mendonca

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42,
Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Key Words

Noonan syndrome · Genetics · MAPK · PTPN11 · SOS1 ·
RAF1 · Short stature · Genetics

Abstract

Noonan syndrome (NS) is one of the most common syndromes transmitted by a mendelian mode. In recent years, germline mutations that affect components of the RAS-MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway were shown to be involved in the pathogenesis of NS and four rare syndromes with clinical features overlapping with NS: Leopard syndrome, cardio-facio-cutaneous syndrome, Costello syndrome and neurofibromatosis type 1. Several hormones act through receptors that stimulate the RAS-MAPK pathway, and therefore, NS and related disorders represent a remarkable opportunity to study the implication of the RAS-MAPK pathway in different endocrine systems. Additionally, children with NS frequently are referred to the endocrinologist because of short stature, delayed puberty and/or undescended testes in males. In this paper, we review the diagnostic, clinical and molecular aspects of NS and NS-related disorders.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

Introduction

Noonan syndrome (NS; OMIM 163950) is one of the most common syndromes transmitted by a mendelian mode. The incidence of affected individuals is estimated to be between 1:1,000 and 1:2,500 [1, 2]. NS is a clinically heterogeneous disorder predominantly characterized by dysmorphic facial features (fig. 1), congenital heart disease (most commonly pulmonary valve stenosis, hypertrophic cardiomyopathy and atrial septal defects), proportionate post-natal short stature, neck abnormalities and chest deformities [1, 3, 4] (table 1). Mild mental retardation, bleeding diathesis, lymphedema, hearing difficulty and cryptorchidism are also occasionally observed in affected individuals. NS has an equal male to female ratio [5, 6]. Familial cases correspond to approximately 20% of the cases [1] and presented mostly an autosomal dominant inheritance with a near complete penetrance [7].

In recent years, germline mutations that affect components of the RAS-MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway were shown to be involved in the pathogenesis of NS and of four rare syndromes with NS overlapping features: Leopard syndrome (OMIM 151100), cardio-facio-cutaneous syndrome (CFC; OMIM 115150), Costello syndrome (OMIM 218040) and neurofibromatosis type 1 (NF1; OMIM 162200) [8].

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2009 S. Karger AG, Basel
0301-0163/09/0714-0185\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/hre

Alexander A.L. Jorge
Hospital das Clínicas, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular
Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar 155 PAMB, 2 andar Bloco 6
São Paulo 05403-000 (Brazil)
Tel. +55 11 3069 7512, Fax +55 11 3069 7519, E-Mail alexj@usp.br or beremen@usp.br

Fig. 1. NS features: (a) eye abnormalities: ptosis, hypertelorism, epicanthal folds; (b) webbed neck, and (c) ear abnormalities: low-set posteriorly rotated ears and thick helix.

Several hormones, including growth hormone (GH) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1), act through receptors that stimulate the RAS-MAPK pathway, and therefore NS and related disorders represent a remarkable

Fig. 2. Generalized multiple lentigines in a patient with Leopard syndrome.

opportunity to study the implication of the RAS-MAPK pathway in different endocrine systems. Additionally, children with NS are frequently referred to endocrinologists because of short stature, delayed puberty and/or undescended testes in males. Therefore, NS is important in the differential diagnosis of short stature and has important implications in GH therapy [9–11].

Differential Diagnosis of Noonan Syndrome

Although NS girls can be misdiagnosed as Turner syndrome (TS) because of clinical feature similarities between these two syndromes, the presence of hypergonadotrophic hypogonadism and abnormal karyotype in TS girls facilitates the distinction between these two syndromes. Several other disorders, with normal gonadal function and normal karyotype, resemble NS phenotypically and constitute the true differential diagnosis of NS.

Leopard syndrome is an autosomal dominant disorder that shares some clinical characteristics with NS. The acronym refers to the major features: Lentigines, ECG conduction abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonic stenosis, Abnormal genitalia, Retardation of growth and sensorineural Deafness [12, 13]. The presence of café-au-lait spots in early infancy and generalized multiple lentigines after 5–6 years of age are the main characteristics of Leopard syndrome (Fig. 2).

In addition to Leopard syndrome, two other rare syndromes, Costello syndrome and CFC syndrome, present facial features and cardiac malformations that resemble

NS. In comparison with NS, Costello and CFC syndromes present a coarser face and both syndromes are associated with more frequent and severe developmental delay. Costello syndrome patients usually have macrocephaly, cutis laxa, nasal and perioral papillomata, deep palmar and plantar creases, diffuse skin hyperpigmentation and nail dysmorphism, as well as an increased risk of malignancy, especially rhabdomyosarcoma. CFC syndrome patients typically have ectodermal abnormalities such as sparse hair and eyebrows, follicular hyperkeratosis, palmoplantar hyperkeratosis and an ichthyosis-like condition [14, 15].

Clinical Diagnosis of Noonan Syndrome

Diagnosis of NS is primarily based on clinical findings. Generally, classical facial features or a typical cardiac malformation trigger suspicions of NS. In the newborn, facial features can be less apparent, but generalized edema, excess nuchal fold and congenital heart defect can suggest the diagnosis.

Widely variable facial appearance is observed among NS patients, even among patients from the same family [16] or with the same molecular defect [17]. Furthermore, a marked change of phenotype with age from newborn period, infancy, childhood and adolescence to adulthood was classically documented, resulting in a mild phenotype in adult patients [3]. All these facts can contribute to misdiagnosis, especially in patients without congenital heart disease, with mild forms and/or at an older age.

In 1981, Duncan et al. [4] proposed a scoring system for NS diagnosis with 26 items devised on the basis of frequency and severity of NS features in 23 typical patients. This complex first scoring system was difficult for routine use by non-geneticist specialists. In 1993, Sharland et al. [18] proposed that the diagnosis should be based on the presence of typical facial features in a patient with normal chromosomes plus short stature (height $\leq$ 10th centile for sex and age) and/or cardiac defect and/or undescended testicles in males. These new criteria did not allow the diagnosis in patients with mild facial features. Finally, in 1994, van der Burgt et al. [16] proposed a simple and accurate scoring system for the diagnosis of NS based on the variable clinical NS presentation in one family (table 2). The van der Burgt scoring system is the most used model to select patients for molecular studies in recent studies [19–21]. In this scoring system, patients are first classified according to facial features as having typical or suggestive NS characteristics. Typical face and any other major sign or two minor signs establishes the diagnosis of NS, where-

Table 1. Phenotypic abnormalities associated to NS [1, 3, 4]

Characteristics	Sign
Inheritance	Autosomal dominant
Growth	Short stature (postnatal onset) (50–80%) Failure to thrive in infancy (40%)
Head and neck	Triangular face Ear abnormalities (44–90%): low-set posteriorly rotated ears and thick helix Eye abnormalities (95%): ptosis, hypertelorism, epicanthal folds, down-slanting palpebral fissures, strabismus, proptosis, myopia and nystagmus Deeply grooved philtrum with high peaks of upper lip vermilion border (95%) Neck abnormalities (95%): short or webbed neck High-arched palate (45–34%) Dental malocclusion (35%) Low posterior hairline (32%) Micrognathia (22%)
Cardiovascular	Congenital heart defect (50–75%): pulmonary valve stenosis (50%), hypertrophic cardiomyopathy (10%), atrial septal defects (10%) and other (aortic stenosis, ventricular septal defects and mitral insufficiency) Electrocardiogram with left axis deviation and a negative pattern in the left precordial lead
Chest	Thoracic abnormalities (53–70%): flat, funnel, shield or deformed chest, pectus carinatum superiorly and/or pectus excavatum inferiorly
Genitourinary	Cryptorchidism (60–69%) Puberty delay
Skeletal	Cubitus valgus (47%) Hand abnormalities: clinodactyly and brachydactyly and blunt fingertips (30%) Vertebral abnormalities (25%)
Neurologic	Motor developmental delay (26%), language delay (20%) and learning disability (15%) Mental retardation, generally mild (25–35%)
Hematology	Bleeding anomalies (20%), including factor XI or XII deficiencies, von Willebrand's disease, platelet dysfunction and leukemia (in especial juvenile myelomonocytic leukemia – JMML)
Other	Peripheral lymphedema, splenomegaly, deafness
Values in parentheses show percent frequency.	

as patients with suggestive NS face need two major or three minor criteria to confirm the NS diagnosis. Analyses of clinical features in NS patients, who had their diagnosis confirmed by molecular study, demonstrated that

Table 2. Noonan syndrome diagnostic criteria (adapted from van der Burgt et al. [16])

Clinical characteristics	Major	Minor
1 Facial	typical face	suggestive face
2 Cardiac	pulmonary valve stenosis and/or typical ECG	other defects
3 Height	<3rd centile	<10th centile
4 Chest wall	pectus carinatum/excavatum	broad thorax
5 Family history	first-degree relative with definite diagnosis	first-degree relative with suggestive diagnosis
6 Other:	all 3	any of the 3
Mental retardation		
Cryptorchidism		
Lymphatic dysplasia		

Definite NS: typical face + one major or two minor clinical characteristics or suggestive face + two major or three minor clinical characteristics.

no isolated clinical characteristic can ensure the diagnosis of NS; however, the van der Burgt et al. criteria, which take in account the facial features, growth pattern, chest deformity and cardiac defects, have been shown to be an accurate tool for NS diagnosis [22]. For these reasons, we recommend the use of this scoring system by endocrinologists during the evaluation of short stature children to facilitate the recognition of patients with NS.

Genetic Heterogeneity of Noonan Syndrome

In 1994, Jamieson et al. [23] performed a genome-wide scan in a large Dutch NS family and demonstrated a linkage with several markers located at chromosome 12q22-qter. In parallel, they demonstrated the existence of genetic heterogeneity in NS by haplotype analysis of another NS family. Subsequent studies reduced the chromosome 12 interval which contains the NS candidate gene region [24, 25] and several positional candidate approaches were taken to identify the NS disease gene.

Finally, in 2001, Tartaglia et al. [26] demonstrated the presence of heterozygous missense mutations in PTPN11 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; OMIM 176876), a gene mapped to chromosome 12q24.1, in patients with NS. Several further studies confirmed PTPN11 as the most affected gene in NS patients and demonstrated a mutation frequency of 38–100 and 37–52% in individuals with familial and sporadic NS, respectively [7, 19, 27, 28].

Germline PTPN11 mutations have also been detected in Leopard syndrome (OMIM 151100) [12, 13], Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome (OMIM 163955)

[29] and in patients with isolated congenital heart disease [30] showing that mutations in this gene exhibit a broad phenotype spectrum. Furthermore, it is noteworthy that, during the screening of mutations in parents and relatives of NS patients with PTPN11 mutations, some individuals carried the same PTPN11 mutations found in the index case, but exhibited mild NS phenotypes that did not fulfill the NS diagnostic criteria [17, 26, 31, 32]. For these reasons, we investigated 50 children with idiopathic short stature that presented some NS-associated signs, without fulfilling the van der Burgt et al. criteria for NS diagnosis. No mutations were found in this cohort, suggesting that PTPN11 mutations are not involved in the pathogenesis of idiopathic short stature [22].

Specific somatic PTPN11 mutations were also found in leukemia patients, especially in juvenile myelomonocytic leukemia [33]. Additionally, somatic mutations are identified at low frequency in several human cancers [34].

The PTPN11 protein product, SHP-2 (Src homology region 2-domain phosphatase 2), is a ubiquitously expressed cytoplasmic protein member of a subfamily of protein tyrosine phosphatases that contains two Src homology 2 (C-SH2 and N-SH2) domains. Through SH2 domains, SHP-2 binds to activated receptors and adapter proteins that present specific phosphorylated tyrosines. In addition to tyrosine phosphatase actions, SHP-2 may also act as an adapter molecule through phosphorylation of a tyrosine residue at the amino terminus region, thus working as a docking site for other SH-2-containing molecules [35]. Both functions, tyrosine phosphatases and adapter molecules, are obviously relevant to several intracellular signal pathways, including signal transduction of growth factors and cytokines [36, 37]. From the endocrinological point of view,

Table 3. Genetic causes and summary of major features of NS and related disorders

Disorder	Causative gene	Phenotype
Noonan syndrome	PTPN11, SOS1, RAF1, MEK1, KRAS	See table 1
Neurofibromatosis type 1	NF1	Familial cancer syndrome; hallmark features include hyperpigmented skin lesions and benign neurofibromas; learning disabilities are common
Leopard syndrome	PTPN11, RAF1	Multiple lentigines, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonic stenosis, abnormal genitalia, growth retardation and deafness
Costello syndrome	HRAS, KRAS, BRAF, MEK1	Mental retardation, high birth weight, neonatal feeding problems, curly hair, coarse face, thick lips, nasal papillomata, diffuse skin hyperpigmentation, and nail dystrophy
Cardio-facio-cutaneous syndrome	KRAS, BRAF, MEK1, MEK2	Coarse face, congenital heart defects, ectodermal anomalies (follicular and palmar hyperkeratosis), short stature, variable degrees of mental retardation (moderate to severe) and facial features reminiscent of NS and Costello syndrome

SHP-2 is implicated in GH [38, 39], IGF-1 [40], insulin [41] and leptin [42] signaling. The effects of NS *PTPN11* mutation on these hormone actions are still to be evaluated.

The *PTPN11* mutations identified in patients with NS or leukemia are predicted to be gain-of-function changes that augment the capacity of tyrosine dephosphorylation [26]. The SHP-2 mutants positively regulate the signal flux through the RAS/MAPK pathway induced by EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IL-1 (interleukin-1) and TNF-1 (tumor necrosis factor-1), but negatively regulate JAK/STAT signaling [7]. Interestingly, somatic *PTPN11* mutations associated with leukemia presented a higher phosphatase activity than germline mutations identified in NS patients [20, 36]. Additionally, somatic mutations commonly found in leukemias rarely occur as germline mutation in NS patients and vice versa [20, 36], suggesting that somatic *PTPN11* mutations with higher tyrosine phosphatase activity and consequently with more leukemogenic properties could cause embryonic lethality if they occur as germline mutations.

Several other molecules in the RAS/MAPK pathway were involved in NS patients without *PTPN11* mutations: germline KRAS [43], SOS1 [44, 45], RAF1 [46, 47] and MEK [15] mutations were found in 2.3, 21, 10 and 4.3% of NS patients who did not harbor mutations in *PTPN11* gene, respectively. Furthermore, mutations in other RAS/MAPK molecules were also found in patients with NS-like syndromes (table 3). All these mutations, except those found in patients with Leopard syndrome [12, 13],

are characterized by an increase of constitutive function of each mutated protein and consequently increased signal transduction via RAS/MAPK pathway. Due to the clinical and molecular disease mechanisms and similarities between NS and NS-like disorders, it is possible to categorize these syndromes as a group of disorders caused by RAS/MAPK pathway dysregulation.

RAS-MAPK Pathway

RAS proteins (HRAS, NRAS and KRAS) are small guanosine-binding proteins which act as signal switch molecules that integrate extracellular inputs and activate downstream effectors (i.g. 3) [reviewed in 8, 48]. Cell stimulation promotes cycling between inactive GDP-bound to active GTP-bound conformations (RAS-GDP and RAS-GTP). The counterbalancing activities of guanosine nucleotide exchange factors (GNEFs), which facilitate RAS-GTP conformation, and GTPase-activating proteins (GAPs), which increase the RAS intrinsic GTPase activity and act in favor of the RAS-GDP conformation, control RAS activity in vivo.

SOS1 (son of sevenless, drosophila, homolog 1 – OMIM 182530), the major GNEF, is recruited to protein complexes that assemble on activated growth receptors. SOS1 binds to either RAS-GTP or RAS-GDP and displaces guanine nucleotide. Because GTP is much more abundant than GDP in the cytosol, this nucleotide exchange

Fig. 3. RAS/MAPK pathway. Tyrosine-phosphorylated domains of activated tyrosine kinase receptors act as docking sites for several intracellular proteins, which contain SH2 domains such as SHC, SHP-2 and GRB2. These molecules recruit SOS1 which promotes cycling between inactive RAS-GDP to active RAS-GTP. RAS-GTP directly activates the MAPK pathway (RAF-MEK-ERK cascade). ERK kinase can phosphorylate both cytosolic and nuclear substrates, which include transcription factors that control the cell cycle. SHC = Signaling and transforming protein containing Src homology 2 and 3 (SH2 and SH3) domains; SHP-2 = Src homology region 2-domain phosphatase 2; GRB2 = growth factor receptor-bound protein 2; SOS1 = son of sevenless 1; NF1 = neurofibromin; RAS = rat sarcoma viral oncogene homolog; RAF = murine sarcoma viral oncogene homolog; MEK = mitogen-activated kinase kinase; ERK = mitogen-activated kinase.

increases intracellular RAS-GTP levels. In its GTP-bound form, RAS can activate several intracellular pathways, including the MAPK pathway. The RAF-MEK-ERK cascade is the best characterized RAS effector pathway. There are three RAF serine/threonine kinases (ARAF, BRAF and RAF1) that activate the MEK-ERK kinase cascade. ERK kinase can phosphorylate both cytosolic and nuclear substrates, which include transcription factors that control the cell cycle [8, 48].

Mutations in several molecules involved in this cascade were identified in NS and other related syndromes (table 3). It has been proposed that these disorders should be classified together as neuro-cardio-facial-cutaneous syndromes based on a constellation of similar phenotypic features and the central role of hyperactive RAS/MAPK in their pathogenesis [49]. Based on genotype-phenotype correlation, three clusters of genes were proposed [15]:

The first group comprises genes outside the RAS-RAF-MEK chain, which encompasses those upstream of RAS. Most patients with PTPN11 or SOS1 mutation have NS or Leopard syndrome. NF1 is caused by mutations in neurofibromin, a GAP protein involved in RAS inactivation. Mutations in this group of genes usually lead to a NS phenotype, with a low rate of mental impairment and a low rate of keratinization disorders, but a tendency to

patchy skin hyperpigmentation, and, at least for NF1 and PTPN11, a slightly increased risk of leukemia [15].

The second group comprises KRAS and the cascading genes downstream. Mutations in these genes usually affect the cognitive functions, have more influence on somatic growth, skin redundancy, keratinization, and hair development, and usually result in a CFC syndrome phenotype. Malignancy risk appears to be low, but could include leukemias [15].

The third group is restricted to HRAS. Diffuse hyperpigmentation, papillomata, chaotic atrial fibrillation and a tendency for soft-tissue tumors are the most distinguishing phenotypic features in this group and usually result in a Costello syndrome phenotype [15].

Germline Mutations in Genes of RAS/MAPK Pathway and Risk of Neoplasia

Somatic activating RAS mutations occur in ~30% of human cancers: mutations in KRAS are common in pancreatic, colorectal, endometrial, biliary tract, lung and cervical cancer, KRAS and NRAS mutations are prevalent in myeloid malignancies, whereas NRAS and HRAS mutations are found in melanoma and bladder cancer, respectively [8]. BRAF mutations are also frequently

found in thyroid, colorectal and ovarian cancers [8] and somatic PTPN11 mutation is responsible for one third of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) and is less frequent in other leukemias or solid tumors [34].

In contrast with higher malignancy potential of somatic mutations in RAS/MAPK components, germline mutations presented more variable effects and depend on which specific genes are affected. Patients with Costello syndrome are predisposed to rhabdomyosarcoma, ganglioneuroblastoma and bladder cancer due to germline HRAS mutations, whereas patients with NF1 mutations frequently presented neurofibromas and show an increased risk of neurofibrosarcoma, astrocytoma, pheochromocytoma and JMML [8].

NS patients principally present an increase in the prevalence of JMML and multiple giant cell lesions (MGCL), although both conditions affect only a small percentage of patients. It is postulated that *PTPN11* mutations associated with NS-JMML present a higher increase in tyrosine phosphatases activity than mutations only associated with NS and not found in leukemias [20, 36, 50]. MGCL are benign tumor-like lesions most frequently affecting the jaws and are associated with *PTPN11*, *SOS1*, *BRAF* and *MEK1* mutations [51]. It is postulated that dysregulation of the RAS/MAPK pathway represents the common and basic molecular event which predisposes to MGCL.

The finding that the same molecular defects can be found in NS patients with or without concomitant JMML or MGCL indicates that NS-related heterozygous mutations in RAS/MAPK pathway components are not sufficient to produce both conditions and an additional unknown factor (modifier gene, epigenetic factors or somatic second hit) is necessary for JMML or MGCL development [51].

RAS/MAPK Pathway Dysregulation and Its Consequences for the Endocrine System

The consequences of NS and NS-related disorders with molecular RAS/MAPK pathway defects for the endocrine system remain mostly unexplored. One of the cardinal signs of NS is short stature [3, 4], although the physiopathological cause of growth impairment remains unclear. GH is essential for normal post-natal growth and exerts its action after binding to a specific receptor that phosphorylates several tyrosine residues located in the intracellular domain. Tyrosine dephosphorylation leads to the physiological interruption of the GH pathway.

It has been consistently documented that SHP-2, the PTPN11 gene-encoded protein, negatively regulates GHR-JAK2-STAT5 signaling [39, 52]. Thus, the increased tyrosine phosphatase action of the SHP-2 protein, observed in PTPN11-mutated NS children, is expected to cause decreased GH action and consequently negatively influence individual stature. We demonstrated that NS children with PTPN11 gain-of-function mutations presented lower growth velocity and lesser height SDS gain during GH therapy than patients with NS without PTPN11 mutations [10]. These clinical findings were also observed in two other studies [9–11], suggesting that PTPN11 mutations can cause partial GH insensitivity at post-receptor level and appears to be a pharmacogenetic predictor of GH responsiveness [53].

Additionally, NS patients with *SOS1* mutations, a molecule that was not directly involved in the GHR-JAK2-STAT5 pathway, more frequently have normal height [44, 45]. These NS patients also presented a high frequency of fetal macrosomia and macrocephaly, possibly due to the increase in the RAS-MAPK pathway caused by NS-associated *SOS1* mutations and its positive influences on fetal growth [44, 45].

Patients with NS often present delayed puberty and NS boys frequently have cryptorchidism. Several cytokines, tyrosine and G-protein-coupled receptors are involved in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Insulin acts through a tyrosine kinase receptor, and thus, the reproductive and metabolic effects of different NS-related molecular defects are still to be elucidated.

In summary, NS is a common condition and an important differential diagnosis in children with short stature, cryptorchidism and delayed puberty, conditions frequently seen by endocrinologists. Germline mutations that affect several components of RAS-MAPK pathway are involved in the pathogenesis of NS and can be diagnosed by molecular studies. Genotype-phenotype correlation studies are still necessary to better characterize the effect of RAS/MAPK pathway dysregulation on endocrine and metabolic systems.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (05/04726-0 and 07/59555-0 to A.C.M.) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (301246/95-5 to B.B.M., 300938/06-3 to I.J.P.A. and 307951/06-5 to A.A.L.J.). The authors thank Prof. Martin O. Savage for his useful suggestions.

References

- 1 Mendez HM, Opitz JM: Noonan syndrome: a review. *Am J Med Genet* 1985;21:493–506.
- 2 Nora JJ, Nora AH, Sinha AK, Spangler RD, Lubs HA: The Ullrich-Noonan syndrome (Turner phenotype). *Am J Dis Child* 1974;127:48–55.
- 3 Allanson JE: Noonan syndrome. *J Med Genet* 1987;24:9–13.
- 4 Duncan WJ, Fowler RS, Farkas LG, Ross RB, Wright AW, Bloom KR, Huot DJ, Sondheimer HM, Rowe RD: A comprehensive scoring system for evaluating Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 1981;10:37–50.
- 5 Jongmans M, Sistermans EA, Rikken A, Nillesen WM, Tamminga R, Patton M, Mair 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;134:165–170.
- 6 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;92:128–132.
- 7 Tartaglia M, Gelb BD: Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:45–68.
- 8 Schubert S, Shannon K, Bollag G: Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:295–308.
- 9 Binder G, Neuer K, Ranke MB, Wittekindt NE: PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5377–5381.
- 10 Ferreira LV, Souza SA, Arnhold IJ, Mendonça BB, Jorge AA: PTPN11 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11) mutations and response to growth hormone therapy in children with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5156–5160.
- 11 Limal JM, Parfait B, Cabrol S, Bonnet D, Leheup B, Lyonnet S, Vidaud M, Le Bouc Y: Noonan syndrome: relationships between genotype, growth, and growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:300–306.
- 12 Legius E, Schrandt-Stumpel C, Schollen E, Pulles-Heintzberger C, Gewillig M, Fryns JP: PTPN11 mutations in Leopard syndrome. *J Med Genet* 2002;39:571–574.
- 13 Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, Marino B, Pizzuti A, Dal-lapiccola B: Grouping of multiple-lentiginos/Leopard and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. *Am J Hum Genet* 2002;71:389–394.
- 14 Schubert S, Bollag G, Shannon K: Deregulated Ras signaling in developmental disorders: new tricks for an old dog. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:15–22.
- 15 Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Arveiler B, Lacombe D, Pasmant E, Parfait B, Baumann C, Heron D, Sigaudy S, Toutain A, Rio M, Goldenberg A, Leheup B, Verloes A, Cave H: Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet* 2007;44:763–771.
- 16 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 Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 1994;53:187–191.
- 17 Zenker M, Buheiteil G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W, Tietze HU, Doerr HG, Hofeck M, Singer H, Reis A, Rauch A: Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr* 2004;144:368–374.
- 18 Sharland M, Morgan M, Smith G, Burch M, Patton MA: Genetic counselling in Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 1993;45:437–440.
- 19 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;10:186–191.
- 20 Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, Zampino G, Burgt I, Palleschi A, Petrucci TC, Sorcini M, Schoch C, Foa R, Emanuel PD, Gelb BD: Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet* 2006;78:279–290.
- 21 Yoshida R, Hasegawa T, Hasegawa Y, Nagai T, Kinoshita E, Tanaka Y, Kanegane H, Ohyama K, Onishi T, Hanew K, Okuyama T, Horikawa R, Tanaka T, Ogata T: Protein-tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 mutation analysis and clinical assessment in 45 patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3359–3364.
- 22 Ferreira LV, Souza SC, Montenegro LR, Malaquias AC, Arnhold IJ, Mendonça BB, Jorge AA: Analysis of PTPN11 gene in idiopathic short stature children and Noonan syndrome patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:426–431.
- 23 Jamieson CR, van der Burgt I, Brady AF, van Reen M, Elswawi MM, Hol F, Jeffery S, Patton MA, Mariman E: Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12. *Nat Genet* 1994;8:357–360.
- 24 Brady AF, Jamieson CR, van der Burgt I, Crosby A, van Reen M, Kremer H, Mariman E, Patton MA, Jeffery S: Further delineation of the critical region for Noonan syndrome on the long arm of chromosome 12. *Eur J Hum Genet* 1997;5:336–337.
- 25 Legius E, Schollen E, Matthijs G, Fryns JP: Fine mapping of Noonan/cardio-facio-cutaneous syndrome in a large family. *Eur J Hum Genet* 1998;6:32–37.
- 26 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, Kuchelapati RS, Gelb BD: Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001;29:465–468.
- 27 Ferreira LV, Souza SA, Montenegro LR, Arnhold IJ, Pasqualini T, Heinrich JJ, Keselman AC, Mendonça BB, Jorge AA: Phenotype variability in Noonan syndrome patients with and without PTPN11 mutation (in Portuguese). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:450–456.
- 28 Zenker M, Voss E, Reis A: Mild variable Noonan syndrome in a family with a novel PTPN11 mutation. *Eur J Med Genet* 2007;50:43–47.
- 29 Bertola DR, Kim CA, Pereira AC, Mota GFA, Krieger JE, Vieira IC, Valente M, Loreto MR, Magalhães RP, Gonzales CH: Are Noonan syndrome and Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome distinct entities? *Am J Med Genet* 2001;98:230–234.
- 30 Weismann CG, Hager A, Kaemmerer H, Maslen CL, Morris CD, Schranz D, Kreuder J, Gelb BD: PTPN11 mutations play a minor role in isolated congenital heart disease. *Am J Med Genet A* 2005;136:146–151.
- 31 Bertola DR, Pereira AC, de Oliveira PS, Kim CA, Krieger JE: Clinical variability in a Noonan syndrome family with a new PTPN11 gene mutation. *Am J Med Genet* 2004;130A:378–383.
- 32 Kitsiou-Tzeli S, Papadopoulou A, Kanakantzenbein C, Fretzayas A, Daskalopoulos D, Kanavakis E, Nicolaidou P: Does the rare A172G mutation of PTPN11 gene convey a mild Noonan syndrome phenotype? *Horm Res* 2006;66:124–131.
- 33 Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, Hahlen K, Hasle H, Licht JD, Gelb BD: Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2003;34:148–150.
- 34 Bentires-Alj M, Paez JG, David FS, Keilhack H, Halmos B, Naoki K, Maris JM, Richardson A, Bardelli A, Sugarbaker DJ, Richards WG, Du J, Girard L, Minna JD, Loh ML, Fisher DE, Velculescu VE, Vogelstein B, Meyerson M, Sellers WR, Neel BG: Activating mutations of the Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004;64:8816–8820.

- 35 Van Vactor D, O'Reilly AM, Neel BG: Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:112–126.
- 36 Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T, Ishikiriya S, Kawame H, Kamasaki H, Yamanaka T, Takada F, Nishio K, Sakurai M, Tamai H, Nagashima T, Suzuki Y, Kure S, Fujii K, Imaizumi M, Matsubara Y: Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *J Hum Genet* 2005;50:192–202.
- 37 Schubbert S, Lieuw K, Rowe SL, Lee CM, Li X, Loh ML, Clapp DW, Shannon KM: Functional analysis of leukemia-associated PTPN11 mutations in primary hematopoietic cells. *Blood* 2005;106:311–317.
- 38 Kim SO, Jiang J, Yi W, Feng GS, Frank SJ: Involvement of the Src homology 2-containing tyrosine phosphatase SHP-2 in growth hormone signaling. *J Biol Chem* 1998;273:2344–2354.
- 39 Stofega MR, Herrington J, Billestrup N, Carter-Su C: Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2, and STAT5B. *Mol Endocrinol* 2000;14:1338–1350.
- 40 Maile LA, Clemmons DR: Regulation of insulin-like growth factor I receptor dephosphorylation by SHPS-1 and the tyrosine phosphatase SHP-2. *J Biol Chem* 2002;277:8955–8960.
- 41 Lima MH, Ueno M, Tirone AC, Rocha EM, Carvalho CR, Saad MJ: Regulation of IRS-1/SHP2 interaction and AKT phosphorylation in animal models of insulin resistance. *Endocrine* 2002;18:1–12.
- 42 Carpenter LR, Farruggella TJ, Symes A, Karow ML, Yancopoulos GD, Stahl N: Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6061–6066.
- 43 Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll 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;38:331–336.
- 44 Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, Li L, Yassin Y, Tamburino AM, Neel BG, Kucherlapati RS: Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39:70–74.
- 45 Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, Pandit B, Oishi K, Martinelli S, Schackwitz W, Ustaszewska A, Martin J, Bristow J, Carta C, Lepri F, Neri C, Vasta I, Gibson K, Curry CJ, Siguero JP, Digilio MC, Zampino G, Dallapiccola B, Barsagi D, Gelb BD: Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39:75–79.
- 46 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, Lopez 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;39:1007–1012.
- 47 Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, Kamisago M, Momma K, Katayama H, Nakagawa M, Fujiwara Y, Matsushima M, Mizuno K, Tokuyama M, Hirota H, Muneuchi J, Higashinakagawa T, Matsuoka R: Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39:1013–1017.
- 48 Shannon K, Bollag G: Sending out an SOS. *Nat Genet* 2007;39:8–9.
- 49 Bentires-Alj M, Kontaridis MI, Neel BG: Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat Med* 2006;12:283–285.
- 50 Keilhack H, David FS, McGregor M, Cantley LC, Neel BG: Diverse biochemical properties of SHP2 mutants. Implications for disease phenotypes. *J Biol Chem* 2005;280:30984–30993.
- 51 Neumann TE, Allanson J, Kavamura I, Kerr B, Neri G, Noonan J, Cordeddu V, Gibson K, Tzschach A, Kruger G, Hoeltzenbein M, Goetze TO, Kehl HG, Albrecht B, Luczak K, Sasiadek MM, Musante L, Laurie R, Peters H, Tartaglia M, Zenker M, Kalscheuer V: Multiple giant cell lesions in patients with Noonan syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* 2008; [Epub ahead of print].
- 52 Chen Y, Wen R, Yang S, Schuman J, Zhang EE, Yi T, Feng GS, Wang D: Identification of SHP-2 as a STAT5A phosphatase. *J Biol Chem* 2003;278:16520–16527.
- 53 Padidela R, Camacho-Hubner C, Attie KM, Savage MO: Abnormal growth in Noonan syndrome: genetic and endocrine features and optimal treatment. *Horm Res* 2008;70:129–136.

Apêndice 2: Artigo do ABEM

clinical case report

Co-occurring *PTPN11* and *SOS1* gene mutations in Noonan syndrome: does this predict a more severe phenotype?

Coocorrência de mutações nos genes *PTPN11* e *SOS1* na síndrome de Noonan: este achado prediz um fenótipo mais grave?

Amanda Salem Brasil¹, Alessandra C. Malaquias²,
Luciana Turolla Wanderley¹, Chong Ae Kim¹, José Eduardo Krieger³,
Alexander A. L. Jorge⁴, Alexandre C. Pereira³, Débora Romeo Bertola¹

SUMMARY

Noonan syndrome (NS) is an autosomal dominant disorder, with variable phenotypic expression, characterized by short stature, facial dysmorphisms and heart disease. Different genes of the RAS/MAPK signaling pathway are responsible for the syndrome, the most common are: *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, and *KRAS*. The objective of this study was to report a patient with Noonan syndrome presenting mutations in two genes of RAS/MAPK pathway in order to establish whether these mutations lead to a more severe expression of the phenotype. We used direct sequencing of the *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, and *KRAS* genes. We have identified two described mutations in heterozygosity: p.N308D and p.R552G in the genes *PTPN11* and *SOS1*, respectively. The patient has typical clinical features similar to the ones with NS and mutation in only one gene, even those with the same mutation identified in this patient. A more severe or atypical phenotype was not observed, suggesting that these mutations do not exhibit an additive effect.

Arq Bras Endocrinol Metab. 2010;54(8):717-22

SUMÁRIO

A síndrome de Noonan (SN) é uma doença gênica autossômica dominante, com expressão clínica variável, caracterizada por baixa estatura, dismorfismos faciais e cardiopatia. Diferentes genes da via de sinalização RAS/MAPK são responsáveis pela síndrome, sendo as mais frequentes: *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*. O objetivo deste estudo foi relatar um paciente com SN que apresenta mutações em dois genes da via RAS/MAPK a fim de estabelecer se essas mutações levam a uma expressão mais grave do fenótipo. Utilizou-se sequenciamento direto dos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*. Foram identificadas duas mutações em heterozigose previamente descritas: p.N308D e p.R552G nos genes *PTPN11* e *SOS1*, respectivamente. A paciente apresenta quadro clínico típico semelhante ao dos pacientes com SN e mutação em um único gene, mesmo naqueles com a mesma mutação identificada na paciente. Não foi observado um fenótipo mais grave ou atípico na paciente, sugerindo que as mutações não apresentam um efeito aditivo. Arq Bras Endocrinol Metab. 2010;54(8):717-22

¹ Genetics Unit, Children's Institute, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

² Endocrinology of Development Unit, Hormone and Molecular Genetics Laboratory, LIM/42, HC-FMUSP, São Paulo, SP, Brazil

³ Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart's Institute (InCor), HC-FMUSP, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Endocrinology-Genetics Unit – LIM/25, Discipline of Endocrinology, HC-FMUSP, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to:

Amanda Salem Brasil
Unidade de Genética,
Instituto da Criança, HC-FMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 647
05403-900 – São Paulo, SP, Brazil
amandasb@usp.br
debora.bertola@icr.usp.br

Received on Aug/2/2010
Accepted on Nov/15/2010

INTRODUCTION

Noonan syndrome (NS; OMIM 163950) is an autosomal dominant disorder with an estimated incidence between 1/1,000 and 1/2,500 (1). The

main clinical features, which are extremely variable, include short stature, facial dysmorphisms, webbed neck, cardiac abnormalities (especially pulmonary stenosis and hypertrophic cardiomyopathy) and cryptorchidism in the males [Reviewed in ref. (2)].

The molecular background was recently unveiled. Different genes of the RAS/MAPK signaling pathway are responsible for NS (Table 1) (3-11). Mutation in the *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* and *KRAS* genes, usually leading to a gain-of-function, is found in approximately 70% of NS (12) cases. Mutations in other genes in this pathway are rarely described in NS patients, including *BRAF*, *MEK1*, *MEK2*, *SHOC2* and *CBL* (12,13).

Due to the complexity of the molecular analysis in NS, previous studies have screened patients initially for the *PTPN11* gene, the main gene in the syndrome. Only in those patients who were negative for mutations in this gene, were the other genes subsequently analyzed until a mutation was found.

Several hormones, including growth hormone (GH) (2) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1), act through receptors that stimulate the RAS/MAPK pathway, and therefore, NS and related disorders represent a remarkable opportunity to study the implication of the RAS/MAPK pathway in different endocrine systems. Additionally, children with NS are frequently referred to endocrinologists because of short stature, delayed puberty and/or undescended testes in males. Therefore, NS is important in the differential diagnosis of short stature and has important implications in GH therapy.

Recently, two groups described NS patients presenting two mutations in different RAS/MAPK pathway-related genes (14,15). In both studies, one of the mutations predicted to affect the protein function (pathogenic mutation), while the other mutation predicted to be benign (uncertain pathogenicity).

To evaluate if the variable expressivity in this syndrome is due partially to the presence of more than one mutation in genes of the RAS/MAPK pathway, we screened a cohort of NS syndrome patients for the main responsible genes – *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* and *KRAS*. Herein, we report on a single patient presenting two pathogenic mutations in the main genes responsible for NS – *PTPN11* and *SOS1*.

Table 1. Major genes of RAS/MAPK signaling pathway involved with Noonan syndrome

Locus	Mutation Gene	(%)	Reference
12q24.1	<i>PTPN11</i>	29-70	(4,12)
2p22.1	<i>SOS1</i>	17-28 ^a	(9,11)
3p25.1	<i>RAF1</i>	9 ^a -17 ^a	(6,7)
12p12.1	<i>KRAS</i>	2 ^a -6 ^a	(3,5)

a) In patients without *PTPN11* gene mutation; b) In patients without *PTPN11* and *SOS1* genes mutation.

CASE REPORT

The proband, a 10 year-old female, is the only child of non-consanguineous parents. Her mother was 22 years old and her father 36 years old at the time of conception, both parents had normal height (mother's height = 158 cm and father's height = 183 cm). She was born at term, by vaginal delivery, with a birth weight of 2,710 g (-1.3 SDS) and length of 48 cm (-0.5 SDS). A heart murmur was audible and a diagnosis of pulmonary stenosis was disclosed. She was first evaluated at our cardiology clinic and a cardiac surgery was indicated at the age of 3 years and 3 months due to the presence of valvar and supravalar pulmonary stenosis and ostium secundum atrial septal defect (ASD) on the echocardiogram. EKG showed signs of right ventricular hypertrophy. At the first evaluation she was 89 cm tall (height SDS = -1.8), weighed 11,100 g (body mass index SDS = -1.5) and her head circumference was 47.2 cm (-1.5 SDS). She had Noonan syndrome-related dysmorphisms (Figure 1): mild hypertelorism, left ptosis, slight proptosis, malocclusion, high arched palate, overfolded pinnae; webbed neck; sternal deformity (*pectus carinatum* superiorly and *excavatum* inferiorly); hepatosplenomegaly and distal joints hiperextensibility. No evident ectodermal findings were disclosed. She had normal developmental milestones. Complementary exams showed normal abdominal ultrasound, spine X-ray, bone age, hematological studies, including factor XI analysis and karyotype. Ophthalmologic evaluation demonstrated prominent corneal nerves on slit-lamp exam. At the age of 10 years, she is enrolled at a regular school, without major difficulties. A positive family history of NS was not uncovered, either by the physical exam of the mother or by medical history and photographs of the father.

Figure 1. Noonan syndrome patient showing typical NS facial dysmorphisms: hypertelorism, left ptosis and slight proptosis.

SUBJECTS AND METHODS

Molecular studies

This patient was included in an on-going cohort study of NS, approved by the Institutional Ethics Committee of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (HC-FMUSP). Briefly, venous blood was drawn for genomic DNA extraction from peripheral leukocytes using a salting-out protocol.

PTPN11 exons 2-15 (Reference sequence: NC_000012.11), *SOS1* exons 1-23 (NC_000002.11), *RAF1* exons 7, 14, and 17 (NC_000003.11) and *KRAS* exons 2-6 (NC_000012.11) were amplified using specific intronic primers (primer sequences and amplification protocols will be sent upon request). PCR products from these exons were directly sequenced with dideoxy chain-termination method using a kit ABI Prism™ BigDye Terminator (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) and analyzed by an autosequencer ABI Prism Genetic Analyser 3100 automatic DNA sequencer (Perkin Elmer). Genotype sequences were manually observed using DNASTAR SeqMan – Laser Gene. New allelic variants identified in *SOS1* were also investigated in 192 control individuals (384 alleles).

In silico prediction of mutation effects

Missense variants identified by sequencing were classified based on their potential impact on protein function or structure, using a new version of the PolyPhen method (16). These predictions are based on the analysis of multiple sequence alignments of homologous proteins, functional annotation and structural information. PolyPhen defines the predictions of the mutations as follows: 1) probably damaging: it is with high confidence that it is supposed to affect protein function or structure, 2) possibly damaging: it is supposed to affect protein function or structure and 3) benign: it is most likely that it lacks any phenotypic effect.

Another investigation of the variations identified in this study include a tool for whole genome compara-

tive analysis of the human genome using the VISTA Genome Browser (17). Multiple amino acid alignments were built using wild-type and mutated human sequence and wild-type *Fugu rubripes*, *Pan troglodytes*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, *Canis familiaris*, *Danio rerio* and *Trichoplax adhaerens* sequences.

Laboratory evaluation

GH and insulin were measured by an immunofluorometric assay (AutoDELFIA®, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Cut-off levels used to rule out GH deficiency diagnosis after stimulation test were peak GH levels > 3.3 µg/L: (18). IGF-1 and IGFBP-3 were measured by chemiluminescence assays (IMMULITE, Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA, USA) and expressed as SDS for age and sex according to reference values provided by the assay kit.

RESULTS

Molecular results

Positive molecular findings are summarized in table 2. No mutation was identified in the *KRAS* and *RAF1* genes. One previously described mutation in *PTPN11* was identified in the heterozygous state [p.N308S (14)]. Direct sequencing of *SOS1* revealed two heterozygous allelic variants: one previously described mutation [p.R552G (9)] and a new variant p.A708T. For the two previously described mutations, the alterations are predicted to be probably damaging and amino acid residues are conserved between different species. On the other hand, the new alteration found (p.A708T in the *SOS1* gene), is predicted to be benign and is not conserved among species. Furthermore, a control group was screened and this specific gene alteration was present in 4 out of 192 control individuals in the heterozygous state (allelic frequency of 1%), characterizing a polymorphism in our population. The patient's mother had none of these three described allelic variants. Unfortunately, DNA from the father was not available.

Table 2. Summary of the mutations found in the presently described Noonan syndrome patient

Gene	Exon	Nucleotide	Amino Acid	Described	PolyPhen	VISTA Genome Browser
<i>PTPN11</i>	8	c.A1121G	p.N308S	Yes ^a	Probably damaging	Conserved
<i>SOS1</i>	10	c.A1654G	p.R552G	Yes ^b	Probably damaging	Conserved
<i>SOS1</i>	13	c.G2122A	p.A708T	No	Benign	No conserved

a) Literature for p.N308S in *PTPN11* gene (10,19-23); b) Literature for p.R552G in *SOS1* gene (9,11,24-26); PolyPhen (16); VISTA Genome Browser (17).

Phenotype analysis

The present patient, who has co-occurring mutations in the *PTPN11* and *SOS1* genes, did not have a more severe phenotype than those NS patients with mutations only in *PTPN11* or *SOS1*. In our group we identified five other NS patients with p.N308S mutation in the *PTPN11* gene and one patient with p.R552G mutation in the *SOS1* gene (14,27). The phenotype of these patients did not significantly differ from the patient harboring both mutations (Table 3).

Table 3. Clinical phenotype of NS patient with co-occurrence of *PTPN11* (p.N308D) and *SOS1* (p.R552G) pathogenic mutations in comparison with NS patients with only one of the genes.

Mutation(s)	p.N308S (<i>PTPN11</i>) and p.R552G (<i>SOS1</i>)	p.N308S (<i>PTPN11</i>)	p.R552G (<i>SOS1</i>)
Patient(s)	1	5	1
Typical facial features	+	5/5	+
Pulmonary stenosis	+	2/5	-
Sternal deformity	+	3/5	+
Development delay	-	2/5	-
Height SDS ^a	-1.8	-1.2 to -3.9	-1.5
Height SDS ^b	0.2	-2.1 to +1.2	0.4
BMI SDS	-1.5	-1.0 to 0.1	1.3

Height SDS was calculated using age- and gender-specific norms (a) for general population (28) and (b) specific for Noonan syndrome patients (29).

Hormonal analysis

Patient had normal metabolic evaluation for her age: fasting glucose and insulin were 77 mg/dL (4.2 mmol/L) and < 2.5 µU/mL, respectively. She also had an unremarkable lipid profile (Total cholesterol of 136 mg/dL, HDL-cholesterol of 40 mg/dL and triglycerides of 98 mg/dL). IGF-1 and IGFBP-3 levels were at the lower normal range for sex and age (61 µg/L and 2.0 µg/mL, respectively; both corresponding to -1.7 SDS). During the clonidine test to evaluate GH secretion, the patient had a GH peak of 8.5 µg/L, ruling out GH deficiency. These hormonal findings were similar to the ones observed in other NS patients in our group (30).

DISCUSSION

In the present study we described a NS patient with simultaneous pathogenic mutations in two of the most common genes associated with NS – *PTPN11* and *SOS1*. The patient has typical features of NS – short

stature, classic facial features, webbed neck and the specific heart defect (pulmonary stenosis associated with atrial septal defect).

Missense heterozygous mutations in the *PTPN11* gene are found in approximately 50% of NS patients (19), clustered especially in exons 3, 8, and 13. Different from exons 3 and 13, in which the mutations are spread, mutations in exon 8 mainly involve residue 308. Indeed, the most frequent mutation found in NS is p.N308D (10,19). Mutation p.N308S has also been found in several studied patients (10,19-23).

Regarding the *SOS1* gene, two gene alterations were found in our patient. The p.R552G is a known pathogenic mutation, the most frequent one in this gene associated with NS (9,11,24-26). Concerning the novel p.A708T, additional analysis (*in silico* analysis and a control group test) showed that this gene alteration is a polymorphism in our population and most probably is not associated to significant phenotypic effects.

Although a clear genotype-phenotype correlation in NS has not been established, patients presenting mutations in *PTPN11* tend to show a higher prevalence of pulmonary stenosis, short stature, sternal deformity and bleeding diathesis (10,19). Specifically for the mutation p.N308D, Tartaglia and cols. (19) demonstrated that the patients required less special education, compared to other described mutations in *PTPN11* gene. For the *SOS1* gene, patients presenting mutations in this gene showed more ptosis, ectodermal signs, such as keratosis pilaris and curly hair, and normal intelligence (11). Roberts and cols. (25) showed that their patients also had a high frequency of pulmonary stenosis, but ASD was relatively rare. On the other hand, Tartaglia and cols. (9) found less short stature in their patients.

The proband here presented does not show atypical findings or a more severe phenotype than NS patients with isolate mutations – even when compared to patients with p.N308S or p.R552G mutations in *PTPN11* and *SOS1*, respectively. Some of the features presented by our patient are common to mutations in both genes, such as the typical facial features and the cardiac lesion – valvar pulmonary stenosis. On the other hand, the proband showed short stature, ASD and lack of evident ectodermal findings, which is more consistent with the phenotype of patients harboring mutations in the *PTPN11* gene (9-11,19,25).

The genes here involved (*PTPN11* and *SOS1*), coding for upstream proteins of the RAS/MAPK signaling pathway, are closely connected to SHC and GRB2

proteins. All these proteins belong to the same complex that has the function of exchanging GDP for GTP to activate the RAS-RAF-MEK-ERK cascade. Mutations in *PTPN11* and *SOS1* reported here, commonly lead to a gain-of-function of the RAS/MAPK pathway. The fact that we did not observe a more severe phenotype in our patient with mutations in both genes suggests that mutations in these two genes do not have additive effects, leading to a typical NS phenotype.

The occurrence of two known pathogenic mutations in genes of the RAS/MAPK pathway in NS has not been described before. Two previous studies (14,15), including one from our group, showed the presence of one known pathogenic mutation and another gene alteration that probably functions as a modifier. We described a NS patient presenting the pathogenic p.N308D mutation in the *PTPN11* gene and also the p.N85S mutation in the *KRAS* gene (14). The patient presented typical features of NS and learning disabilities, which is not common, but far from an exception, in individuals with the p.N308D mutation in the *PTPN11* gene. Ekvall and cols. (15) reported on a NS patient presenting mild psychomotor developmental delay, hoarse voice, osteoporosis, loose anagen hair, gingival hyperplasia, spinal neuroblastoma and liver haemangioma, and mutations in the *SHOC2* gene (p.S2G) and *PTPN11* gene (p.G409A). The mother, presenting only short stature, also showed this latter gene alteration. The authors concluded that the p.G409A mutation in the *PTPN11* gene represents a mild partial mutation, acting as a modifier. On the other hand, the report of two pathogenic mutations in patients presenting neurofibromatosis-Noonan syndrome (NFNS) have been previously described (31,32) but in both cases one of the parents had one of the mutations, which increases the chance of this occurrence.

The rate of new mutations is very low in general and the presence of two mutations in our case is out of the ordinary. Unfortunately, we were not able to rule out with certainty that the father comprised one of these mutations, but photographs failed to show any facial features suggestive of NS. Besides, there is no history of heart problems and he has a height of 1 SD above the mean.

The great variability in the phenotype of NS patient still remains to be properly elucidated. The presence of two different pathogenic mutations in our patient, which is an extremely rare event, failed to show an important effect in the phenotype. We can speculate that

subtler gene alterations, such as polymorphisms of single nucleotides (SNPs) in genes of this pathway or even other genes associated with environmental factors may modulate the phenotype.

Acknowledgments: this work was supported by grants from Fundacao de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (08/50184-2 and 07/59555-0 to A.C.M.) and from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (301477/2009-4 to A.A.L.J.). The authors thank Noely Ferreira for technical support.

Disclosure: no potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

1. Nora JJ, Nora AH, Sinha AK, Spangler RD, Lubs HA. The Ullrich-Noonan syndrome (Turner phenotype). *Am J Dis Child.* 1974;127(1):48-55.
2. Malaquias AC, Ferreira LV, Souza SC, Arnhold JJ, Mendonça BB, Jorge AA. [Noonan syndrome: from phenotype to growth hormone therapy]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(5):800-8.
3. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A, et al. Germline missense mutations affecting KRAS isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.* 2006;79(1):129-35.
4. Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillissen-Kaesbach G, et al. 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;11(2):201-6.
5. Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, et al. Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet.* 2007;44(12):763-71.
6. Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOP-ARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2007;39(8):1007-12.
7. Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007;39(8):1013-7.
8. Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, et al. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat.* 2009;30(4):695-702.
9. Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007;39(1):75-9.
10. Zenker M, Buheiteil G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W, et al. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr.* 2004;144(3):368-74.
11. Zenker M, Horn D, Wiczorek D, Allanson J, Pauli S, van der Burgt I, et al. SOS1 is the second most common Noonan gene but plays no major role in cardio-facio-cutaneous syndrome. *J Med Genet.* 2007;44(10):651-6.
12. Tartaglia M, Zampino G, Gelb BD. Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis. *Mol Syndromol.* 2010;1(1):2-26.

Co-occurring mutations in Noonan syndrome

13. Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, et al. Heterozygous Germline Mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet.* 2010;87(2):250-7.
14. Brasil AS, Pereira AC, Wanderley LT, Kim CA, Malaquias AC, Jorge AA, et al. PTPN11 and KRAS gene analysis in patients with Noonan and Noonan-like syndromes. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010;14(3):425-32.
15. Ekvall S, Hagenäs L, Annerén G, Bondeson M. Identification of co-occurring SHOC2 and PTPN11 mutations in a patient with Noonan syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(1):90-1.
16. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(17):3894-900.
17. Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Web Server issue):W273-9.
18. Silva EG, Silhessarenko N, Arnhold IJ, Batista MC, Estefan V, Osorio MG, et al. GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. *Horm Res.* 2003;59(5):229-33.
19. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 2002;70(6):1555-63.
20. Ko JM, Kim JM, Kim GH, Yoo HW. PTPN11, SOS1, KRAS, and RAF1 gene analysis, and genotype-phenotype correlation in Korean patients with Noonan syndrome. *J Hum Genet.* 2008;53(11-12):999-1006.
21. Bertola DR. Estudo do gene PTPN11 nos pacientes afetados pela síndrome de Noonan. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.
22. Binder G, Neuer K, Ranke MB, Wittekindt NE. PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5377-81.
23. Sarkozy A, Conti E, Seripa D, Digilio MC, Grifone N, Tandoi C, et al. Correlation between PTPN11 gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. *J Med Genet.* 2003;40(9):704-8.
24. Denayer E, Devriendt K, de Ravel T, Van Buggenhout G, Smeets E, Francois I, et al. Tumor spectrum in children with Noonan syndrome and SOS1 or RAF1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010;49(3):242-52.
25. Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007;39(1):70-4.
26. Alfieri P, Cesarini L, Zampino G, Pantaleoni F, Selicorni A, Salerni A, et al. Visual function in Noonan and LEOPARD syndrome. *Neuropediatrics.* 2008;39(6):335-40.
27. 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.
28. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child.* 1966;41(219):454-71.
29. Ranke MB, Heidemann P, Knupfer C, Enders H, Schmaltz AA, Bie-rich JR. Noonan syndrome: growth and clinical manifestations in 144 cases. *Eur J Pediatr.* 1988;148(3):220-7.
30. Ferreira LV, Souza SA, Montenegro LR, Arnhold IJ, Pasqualini T, Heinrich JJ, et al. [Phenotype variability in Noonan syndrome patients with and without PTPN11 mutation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(3):450-6.
31. Bertola DR, Pereira AC, Passetti F, de Oliveira PS, Messiaen L, Gelb BD, et al. Neurofibromatosis-Noonan syndrome: molecular evidence of the concurrence of both disorders in a patient. *Am J Med Genet A.* 2005;136(3):242-5.
32. Thiel C, Wilken M, Zenker M, Sticht H, Fahsold R, Gusek-Schneider GC, et al. Independent NF1 and PTPN11 mutations in a family with neurofibromatosis-Noonan syndrome. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(6):1263-7.