AMANDA SALEM BRASIL

# Determinantes genéticos na síndrome de Noonan e nas síndromes Noonan-like: investigação clínica e molecular

SÃO PAULO

2011

**AMANDA SALEM BRASIL**

# Determinantes genéticos na síndrome de Noonan e nas síndromes Noonan-like: investigação clínica e molecular

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

Programa de: **Pediatria**

Orientadora: **Dra. Débora Romeo Bertola**

(VERSÃO CORRIGIDA. RESOLUÇÃO COPGR 5890, DE 20 DE DEZEMBRO DE 2010.
A VERSÃO ORIGINAL ESTÁ DISPONÍVEL NA BIBLIOTECA FMUSP)

**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

Brasil, Amanda Salem
Determinantes genéticos na síndrome de Noonan e nas síndromes Noonan-like : investigação clínica e molecular / Amanda Salem Brasil. -- São Paulo, 2011.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.
Orientadora: Débora Romero Bertola.

Descritores: 1.Síndrome de Noonan/genética 2.Síndrome de Noonan/diagnóstico 3.Síndrome de Noonan/fisiopatologia 4.Biologia molecular 5.Mutação 6.Análise mutacional de DNA 7.Genótipo 8.Fenótipo

USP/FM/DBD-374/11

BRASIL, A. S. **Determinantes genéticos na síndrome de Noonan e nas síndromes Noonan-like**: investigação clínica e molecular. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em: ____ / ____ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*À minha Família – meu porto seguro.*

*À minha Mãe, que me criou e me educou, sempre ensinando os valores da vida. É a minha referência.*

*Ao meu grande companheiro Fernando, pelo amor, carinho, companheirismo e apoio incondicional. A gente se entende.*

## AGRADECIMENTOS

A conclusão de uma tese nos faz refletir sobre todos os que contribuíram para que este projeto se concretizasse. Com isso, gostaria de expressar meu carinho e gratidão:

Aos pacientes e seus familiares que possibilitaram a realização deste estudo.

À **Dra. Débora Romeo Bertola**, que me acolheu junto com a **Dra. Chong Ae Kim**, me acompanhando desde a fase de estagiária, depois como mestranda e agora como doutoranda. Agradeço imensamente pela orientação, pelos ensinamentos clínicos, pelo apoio e amizade de sempre. Agradeço aos amigos Israel, Guilherme, Mariana e Caio pela ajuda fundamental no atendimento dos pacientes no ambulatório de Genética do ICr.

Ao amigo **Dr. Alexandre da Costa Pereira**, o qual conheci atrvés da Dra. Débora, e que rapidamente se tornou meu grande Tutor em Biologia Molecular. Sem sua contribuição nada disso seria possível. Agradeço por, junto ao **Prof. José Eduardo Krieger**, abrir as portas do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, que é uma das minhas casas desde o mestrado.

À **Dra. Berenice Mendonça** pelas amostras sequenciadas em seu laboratório. Ao **Dr. Alexander Jorge** e à **Dra. Alexsandra Malaquias** pelo encaminhamento de alguns pacientes e colaboração fundamental neste projeto. À **Mariana Funari** pela dedicação e expertise técnica.

À **Luciana Turolla** pela amizade e auxílio fundamental no estudo molecular. Aos demais amigos do **Grupo de Genética**: Noely, Luciana, Marina, Júlia, Vaquero, Paulo e Diogo entre outros que foram e virão. Obrigada pela ótima convivência e ajuda em todos os momentos.

À **Maúde**, à **Adriana**, à **Cidinha** e aos demais funcionários do ICr, do InCor e do PAMB pela cortesia e colaboração.

À **FAPESP** pelo financiamento deste projeto.

Esta tese está de acordo com:

Interpretação e descrição das variações genéticas: de acordo com *American College of Medical Genet*ics – ACMG (Richards *et al.*, 2008).

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos: de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

**FOLHA DE APROVAÇÃO**.....iii

**DEDICATÓRIA**.....iv

**AGRADECIMENTOS**.....v

**NORMATIZAÇÃO**.....vi

**LISTA DE FIGURAS**.....x

**LISTA DE TABELAS**.....xi

**RESUMO**.....xii

**ABSTRACT**.....xv

**1. INTRODUÇÃO** .....1

1.1. SÍNDROME DE NOONAN .....2

*1.1.1. Incidência*.....2

*1.1.2. Achados Clínicos* .....2

*1.1.3. Prognóstico*.....3

*1.1.4. Tratamento*.....3

*1.1.5. Diagnóstico Clínico* .....4

*1.1.6. Diagnóstico Diferencial*.....5

1.1.6.1. Síndromes Noonan-like .....6

*1.1.7. Estudo Molecular nas síndromes de Noonan e síndromes Noonan-like* .....8

1.1.7.1. Via RAS/MAPK .....10

*1.1.8. Correlação genótipo-fenótipo* .....13

1.1.8.2. Tumores nas RASopatias ..... 14

**2. OBJETIVOS ..... 15**

**3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 17**

3.1. CASUÍSTICA ..... 18

3.2. MÉTODOS ..... 19

*3.2.1. Extração de DNA ..... 20*

*3.2.2. Reação em Cadeia de Polimerase ..... 21*

*3.2.3. Purificação ..... 22*

*3.2.4. Sequenciamento ..... 22*

*3.2.5. Predição para o efeito das mutações ainda não descritas ..... 23*

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 24

**4. RESULTADOS ..... 25**

4.1. ALTERAÇÕES ENCONTRADAS ..... 26

4.2. PREDIÇÃO DO EFEITO DAS MUTAÇÕES AINDA NÃO DESCRITAS ..... 29

4.3. MUTAÇÕES ENCONTRADAS ..... 32

4.4. ACHADOS CLÍNICOS ..... 33

*4.4.1. Síndrome de Noonan ..... 33*

*4.4.2. Síndromes de Noonan-like ..... 37*

*4.4.3. Achados Raros ..... 38*

4.4.3.1. Craniossinostose ..... 38

4.4.3.2. Tumores ..... 38

**5. DISCUSSÃO ..... 40**

5.1. ESTUDO MOLECULAR ..... 41

*5.1.1. Síndrome de Noonan ..... 41*

*5.1.2. Síndromes Noonan-like ..... 42*

*5.1.3. Alterações não descritas encontradas ..... 43*

5.2. ACHADOS CLÍNICOS ..... 44

*5.2.1. Síndrome de Noonan ..... 44*

*5.2.2. Síndromes de Noonan-like ..... 45*

5.3. CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO ..... 45

5.4. ACHADOS RAROS ..... 46

*5.4.1. Craniossinostose ..... 46*

*5.4.2. Tumores ..... 46*

5.5. ESTRATÉGIA DE INVESTIGAÇÃO MOLECULAR ..... 49

**6. CONCLUSÃO ..... 52**

**7. REFERÊNCIAS ..... 54**

**ANEXOS ..... 67**

ANEXO I - SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* PARA GENES ESTUDADOS ..... 68

ANEXO II - ARTIGOS RELACIONADOS A ESTE PROJETO ..... 71

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – O diagrama esquemático mostra a via de sinalização RAS/MAPK .....**11**

**Figura 2** – Fluxograma para estratégia de investigação molecular nas síndromes de Noonan e Noonan-like .....**50**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Critérios diagnósticos da síndrome de Noonan ..... 4

**Tabela 2** – Síndromes Noonan-like e algumas características que as diferenciam da síndrome de Noonan ..... 6

**Tabela 3** - Genes da via RAS/MAPK já associados à síndrome de Noonan e às síndromes Noonan-like ..... 12

**Tabela 4** – Distribuição das alterações encontradas ..... 26

**Tabela 5** – Alterações encontradas no gene *PTPN11* ..... 27

**Tabela 6** – Alterações encontradas no gene *SOS1* ..... 28

**Tabela 7** – Alterações encontradas no gene *RAF1* ..... 28

**Tabela 8** – Alterações encontradas no gene *KRAS* ..... 28

**Tabela 9** – Alterações encontradas no gene *BRAF* ..... 29

**Tabela 10** – Predição para as alterações não descritas encontradas ..... 32

**Tabela 11** – Distribuição e frequência das mutações encontradas ..... 33

**Tabela 12** – Achados clínicos dos propósitos com síndrome de Noonan, com e sem mutação no gene *PTPN11* ..... 34

**Tabela 13** – Achados clínicos dos pacientes com síndrome de Noonan com e sem mutação no gene *SOS1* ..... 34

**Tabela 14** – Achados clínicos dos pacientes com síndrome de Noonan com e sem mutação no gene *RAF1* ..... 35

**Tabela 15** – Achados clínicos dos pacientes com síndrome de Noonan com e sem mutação no gene *KRAS*.....35

**Tabela 16** – Achados clínicos dos pacientes com síndrome de Noonan com e sem mutação no gene *BRAF*.....36

**Tabela 17** – Resumo comparativo das manifestações clínicas em pacientes com síndrome de Noonan e com mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS* e *BRAF*.....36

# RESUMO

Brasil, AS. **Determinantes genéticos na síndrome de Noonan e nas síndromes Noonan-like: investigação clínica e molecular.** 2011. 85 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

A síndrome de Noonan (SN) é uma doença de herança autossômica, relativamente frequente na população e que apresenta heterogeneidade genética. Caracteriza-se por dismorfismos faciais, baixa estatura, pescoço curto/alado, alterações cardíacas, deformidades esternais e criptorquia. A SN apresenta sobreposição dos achados clínicos com outras síndromes mais raras, denominadas síndromes Noonan-like (SNL): síndrome cardio-facio-cutânea (CFC), síndrome de Costello (SC), neurofibromatose-síndrome de Noonan (NFSN), síndrome de Noonan com manchas lentiginosas/síndrome de LEOPARD (SL), síndrome de Noonan-like com perda de cabelos anágenos (SNL-PCA) e síndrome de Noonan-like com leucemia mielomonocítica juvenil (SNL-LMMJ). As SN e SNL decorrem de mutações em genes pertencentes à via de sinalização RAS/MAPK – alguns dos quais são protooncogenes, o que tem despertado o interesse na caracterização do risco de desenvolvimento de neoplasias nessas síndromes. Os objetivos deste estudo visam o sequencimento conjunto dos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *SHOC2*, *BRAF* e *HRAS* em pacientes com diagnóstico clínico das SN e SNL a fim de: determinar a frequência de mutação; estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo; estabelecer um fluxograma para o estudo molecular a partir dos *hotspots*; e avaliar se a variabilidade fenotípica apresentada nos pacientes com SN pode ser explicada pela presença de mutações em mais de um gene da via RAS/MAPK. Foram avaliados 194 probandos - 152 com SN e 42 com SNL (19 CFC, 15 NFNS, 4 CS e 4 LS). Mutações foram identificadas em 99 pacientes – 80 com SN (53%); 19 com SNL. Apenas um paciente com SN apresentou mutação em dois genes da via RAS/MAPK (*PTPN11* e *SOS1*). O estudo molecular na SN mostrou, assim como na literatura, um maior envolvimento do gene *PTPN11* (34%), seguido dos genes *SOS1* (12%) e *RAF1* (7%). A comparação dos achados clínicos, levando em consideração as alterações gênicas, também confirma as correlações já descritas na literatura; entre elas observamos que pacientes com SN e mutação no gene:

*PTPN11*, apresentaram maior frequência de estenose pulmonar valvar (EPV) e baixa estatura; *SOS1*, apresentaram maior frequência de EPV; *RAF1*, apresentaram maior frequência de miocardiopatia hipertrófica, e menor frequência de EPV e déficit intelectual; *SHOC2*, apresentaram anormalidades de cabelo. Na nossa casuística também foram observados alguns achados raros: craniosinostose, tumor expansivo em fossa posterior e a primeira descrição de um tumor sólido (schwanomatose) em um paciente com mutação no gene *KRAS*. A partir deste estudo foi possível estabelecer um fluxograma para investigação molecular devido à correlação genótipo-fenótipo, que embora não seja totalmente precisa, explica parte da grande variabilidade clínica observada – em especial quanto ao tipo de cardiopatia. A presença de mutações em diferentes genes da via RAS/MAPK não é frequente, além de não agravar o fenótipo e não explicar a variabilidade fenotípica observada. Embora um grande avanço no conhecimento sobre SN e SNL tenha sido alcançado, vários aspectos precisam ser melhor elucidados, como: caracterização precisa da propensão ao desenvolvimento de neoplasias, estudos que permitam avaliar as consequências biológicas das mutações, identificação de outros genes responsáveis, assim como outros fatores genéticos e/ou ambientais que possam explicar a variabilidade clínica inter e intrafamilial.

Descritores: 1.Síndrome de Noonan/genética 2.Síndrome de Noonan/diagnóstico 3.Síndrome de Noonan/fisiopatologia 4.Biologia molecular 5.Mutação 6.Análise mutacional de DNA 7.Genótipo 8.Fenótipo

# SUMMARY

Brasil, AS. **Genetic determinants in Noonan syndrome and in Noonan-like syndromes: clinical and molecular study.** 2011. 85 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

Noonan syndrome (NS) is a relatively common, autosomal dominant disease that presents a marked genetic heterogeneity. It is characterized by facial dysmorphisms, short stature, webbed/short neck, cardiac abnormalities, esternal anomalies and cryptorchidism. NS shows clinical overlap of some of its findings with other rarer syndromes, known as Noonan-like syndromes (NLS): cardio-facio-cutaneous syndrome (CFC), Costello syndrome (CS), neurofibromatosis-Noonan syndrome (NFNS), Noonan syndrome with lentiginous stains/LEOPARD syndrome (LS), Noonan-like syndrome with loose anagen hair (NLS-LAH) and Noonan-like syndrome with juvenile myelomonocytic leukemia (NLS-JMML). NS and NLS are related to mutations in genes belonging of RAS-MAPK signaling pathway. Some of these genes are classified as proto-oncogenes. This fact also arouses the interest in the characterization of the risk for cancer development in this group of patients. The objectives of this study are to sequence the genes associated with NS and NLS (*PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *SHOC2*, *HRAS* and *BRAF*) in patients that fulfilled clinical diagnostic criteria for NS or NLS to: determine the frequency of the mutations; establish a genotype-phenotype correlation; estabilish a flowchart for molecular study from the hotspots; and evaluate when the phenotypic variability presented in NS patients can be explained by the presence of mutations in more than one gene of the RAS/MAPK pathway. This study evaluated 194 probands – 152 with NS e 42 with NLS (19 CFC, 15 NFSN, 4 SC e 4 SL). Mutations were identified in 99 patients – 80 with NS (53%), 19 with NLS. Only one patient presented mutation in two different genes of the RAS/MAPK pathway (*PTPN11* and *SOS1*). The molecular analysis showed a predominance of mutations in the *PTPN11* gene (34%), followed by the *SOS1* (12%) and *RAF1* (7%) genes in patients with NS, in accordance with the literature. Patients with NS and mutation in the: *PTPN11* gene, presented a higher frequency of valvular pulmonary stenosis (VPS) and short stature; *SOS1* gene, showed a higher

frequency of VPS; *RAF1* gene, showed a higher frequency of hypertrophic cardiomyopathy and lower frequency of VPS and intellectual deficit; and *SHOC2* gene, showed more hair abnormalities. This genotype-phenotype correlations is also concordant with the literature. In our study, we also observed some rare finds in some patients: craniosynostosis, expansive tumor in the posterior fossa and the first description of a solid tumor (schwanomatose) in a patient with NS and *KRAS* gene mutation. Based on this genotype-phenotype correlation, we have proposed a flowchart for molecular investigation. The presence of mutation in more them one gene of the RAS/MAPK pathway was not frequent; additionally, it did not aggravate the phenotype and could not explain the phenotypic variability observed. Although a great advance in the knowledge about SN and SNL has been achieved, several aspects remain to be clarified, as the exact risk for cancer development, functional studies to assess the biological consequences of the mutations and the identification of other genes, as well as other genetic and/or environmental factors that influence the interand intrafamilial clinical variability.

Descriptors: 1.Noonan syndrome/genetics 2.Noonan syndrome/diagnostics 3.Noonan syndrome/fisiopathology 4. Molecular biology 5.Mutation 6.Mutational DNA analysis 7.Genotype 8.Phenotype

# 1. INTRODUÇÃO

# 1. Introdução

## 1.1. Síndrome de Noonan

### 1.1.1. Incidência

A síndrome de Noonan (SN; *OMIM* 163950) é uma das doenças gênicas de herança autossômica dominante mais frequentes, embora sua incidência não tenha sido determinada com precisão até hoje. Muitos autores citam uma incidência estimada entre 1:1000 e 1:2500 nascidos vivos, relatado por Nora e colaboradores (1974).

### 1.1.2. Achados Clínicos

Os principais achados clínicos incluem: baixa estatura, dismorfismos faciais (hipertelorismo ocular, inclinação para baixo das fendas palpebrais, ptose palpebral e proptose, orelhas com baixa implantação, porção superior da hélice espessada), pescoço curto e/ou alado, deformidade torácica, cardiopatia congênita (principalmente estenose pulmonar valvar e miocardiopatia hipertrófica – EPV e MIOCH), déficit intelectual leve, distúrbios hematológicos e criptorquidia nos meninos (Noonan, 1994). Quando se leva em consideração a anomalia cardíaca presente nos afetados, esta doença é considerada a segunda síndrome genética mais comumente associada a defeitos cardíacos, sendo a primeira a síndrome de Down (Digilio *et al.*, 2001).

Raramente, alguns indivíduos com a síndrome de Noonan podem apresentar lesões ósseas líticas, principalmente em mandíbula e maxila, com características anatomopatológicas que incluem a presença de células gigantes multinucleadas.

Antigamente este achado caracterizava uma doença considerada distinta, conhecida como síndrome de Noonan-like/ lesões múltiplas de células gigantes (Cohen Jr *et al.*, 1974). Atualmente tal característica clínica faz parte do espectro da síndrome de Noonan.

Há uma extrema variabilidade clínica inter e intra-familial na síndrome (Bertola *et al.*, 2004). O fenótipo varia com a idade (Allanson, 1987), podendo apresentar características faciais mais sutis no adulto, o que dificulta ainda mais o diagnóstico.

### 1.1.3. Prognóstico

O prognóstico de pacientes afetados pela SN é bom, exceto nos casos com cardiopatias graves, quando se torna necessária a correção cirúrgica do defeito cardíaco. A déficit intelectual, em geral leve, está presente em 1/3 dos casos, sendo que em alguns é erroneamente interpretada em decorrência de déficit auditivo e dificuldade na fala (Ferreira *et al.*, 2005; Money *et al.*, 1979).

### 1.1.4. Tratamento

O tratamento com hormônio de crescimento (GH) para pacientes com SN e baixa estatura ainda é bastante discutido. Levantamentos publicados são de difícil comparação, devido à heterogeneidade de protocolos e critérios de resultado utilizados. Há casos descritos com deficiência de GH, outros com alteração neuro-secretória e ainda aqueles sem alteração da secreção do GH (Romano *et al.*, 2010). A terapia com GH pode levar a um ganho de altura de até 10 cm, dependendo da idade de inicio e duração do tratamento, e por isso este tratamento é amplamente utilizado em pacientes com SN e deficiência deste hormônio. Porém, nota-se que a estatura adulta é normal em quase 50% dos casos, mesmo sem a intervenção com a terapia hormonal (Tartaglia *et al.*, 2011).

### 1.1.5. Diagnóstico Clínico

O diagnóstico da SN baseia-se primariamente em uma suspeita clínica, entretanto, é um conjunto de vários sinais que leva ao diagnóstico clínico. O critério diagnóstico mais utilizado é o de van der Burgt *et al.* (1994), que leva em consideração: presença de dismorfismos faciais, tipo de cardiopatia, baixa estatura, deformidade esternal e histórico familiar, entre outros (Tabela 1).

**Tabela 1 –** Critérios diagnósticos da síndrome de Noonan

| **Características clínicas** | **A = maior** | **B = menor** |
|---|---|---|
| Face | **Típica** | **Sugestiva** |
| Coração | EPV e/ou ECG típico | Outro defeito cardíaco |
| Estatura | <3º percentil | <10º percentil |
| Tórax | *Pectus carinatum/excavatum* | Tórax largo |
| História familiar | Parente de 1º grau com diagnóstico definitivo de SN | Parente de 1º grau com diagnóstico sugestivo de SN |
| Outros | Presença de: déficit intelectual + criptorquidia + displasia linfática | Presença de: déficit intelectual ou criptorquidia ou displasia linfática |

O indivíduo é considerado afetado pela síndrome de Noonan se apresentar face típica (A = critério maior), associado a mais um critério maior ou dois menores. Se a face for sugestiva (B = critério menor), há necessidade da presença de mais dois critérios maiores ou três menores. EPV, estenose pulmonar valvar; ECG, eletrocardiograma; SN, síndrome de Noonan. Traduzido de van der Burgt (1994)

O diagnóstico da SN também é extremamente importante para o bom manejo dos afetados. Algumas particularidades estão presentes nesta doença, com consequências para o seu tratamento. Este fato é bem documentado, por exemplo, em relação ao tipo de defeito cardíaco e seu tratamento. Como exemplo: nos pacientes que apresentam uma estenose pulmonar valvar como defeito cardíaco, o reconhecimento da SN implica em uma avaliação muito detalhada das valvas cardíacas no sentido de diagnosticar a presença de uma displasia, o que ocorre frequentemente na síndrome. Frente a esta anomalia, nos casos em que há necessidade de uma correção, a valvuloplastia com dilatação por balão nem sempre é efetiva, como ocorre nas formas de estenose pulmonar valvar não sindrômica. Alem disso, aproximadamente 1/3 dos casos pode apresentar um distúrbio de coagulação, com risco cirúrgico aumentado.

A extrema variabilidade clínica inter e intra-familial, e a variabilidade fenotípica etária dificultam o reconhecimento da SN (Allanson, 1987), o que torna o estudo molecular de extrema importância para a confirmação do diagnóstico, especialmente nos casos mais leves.

### 1.1.6. Diagnóstico Diferencial

A **síndrome de Turner** constitui o diagnóstico diferencial mais importante nas pacientes do sexo feminino. A SN e a síndrome de Turner apresentam várias características em comum. Contudo, quanto ao defeito cardíaco, na síndrome de Turner as anomalias mais frequentes são aquelas que acometem o coração esquerdo, especialmente a estenose aórtica e a coartação da aorta, enquanto que na SN a anomalia mais comum é a estenose pulmonar valvar (de Majo *et al.*, 1979). A realização do estudo cromossômico permite confirmar o diagnóstico da síndrome de Turner pela detecção de uma alteração numérica ou estrutural do cromossomo X.

Algumas **aberrações cromossômicas**, como a duplicação do cromossomo 4q31 a qterminal (Bonioli *et al.*, 1980), apresentam sobreposição do quadro clínido com a SN.

Outras síndromes menos frequentes apresentam características muito semelhantes a SN, cada uma com suas peculiaridades. Estas síndromes são denominadas **síndromes Noonan-like** (SNL) e incluem: síndrome cardio-facio-cutânea (CFC; *OMIM* 115150), síndrome de Costello (SC; *OMIM* 218040), neurofibromatose-síndrome de Noonan (NFSN; *OMIM* 601321), síndrome de Noonan com manchas lentiginosas/ síndrome de LEOPARD (SNML/SL; *OMIM* 151100), síndrome de Noonan-like com perda de cabelos anágenos (SNL-PCA; *OMIM* 607721) e síndrome de Noonan-like com leucemia mielomonocítica juvenil (SNL-LMMJ; *OMIM 613563*). As características diferenciais para cada uma das SNL estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2 –** Síndromes Noonan-like e algumas características que as diferenciam da síndrome de Noonan

| SNL | Características diferenciais |
|---|---|
| **CFC** | maior frequência de déficit intelectual e anomalias ectodérmicas, com cabelos esparsos e quebradiços, sobrancelhas esparsas e lesões hiperqueratóticas |
| **SC** | macrocefalia relativa, cabelos encaracolados, dismorfismos faciais, papilomas periorificiais, hiperelasticidade da pele das mãos e dos pés, pregas palmares e plantares profundas, tonalidade mais escura da pele, déficit intelectual |
| **NFSN** | associação das carcterísticas da neurofibromatose tipo I e da síndrome de Noonan, sendo as principais: lesões cutâneas hiperpigmentadas (manchas café com leite), neurofibrmomas e glioma do nervo óptico |
| **SNML/SL** | manchas lentiginosas, miocardiopatia hipertrófica, mutações específicas no gene *PTPN11* (p.Y279C e p.T468M) |
| **SNL-PCA** | deficiência de hormônio de crescimento, defeitos cognitivos, anormalidades de cabelo, displasia da valva mitral e defeitos de septo, voz anazalada, mutação p.S2G no gene *SHOC2* |
| **SNL-LMMJ** | predisposição para LMMJ, mutação no gene *CBL* |

SNL síndrome de Noonan-like, CFC síndrome cardio-facio-cutânea, SC síndrome de Costello, NFSN neurofibromatose-síndrome de Noonan, SNML/SL síndrome de Noonan com manchas lentiginosas/síndrome de LEOPARD, SNL-PCA síndrome de Noonan-like com perda de cabelos anágenos, SNL-LMMJ síndrome de Noonan-like com leucemia mielomonocítica juvenil

### 1.1.6.1. Síndromes Noonan-like

A **síndrome cardio-facio-cutânea** (CFC) foi descrita por Reynolds *et al.* (1986) como uma nova síndrome com envolvimento cardio-facio-cutâneo e déficit intelectual. Caracteriza-se pela presença de: a) retardo de crescimento e do desenvolvimento; b) hidrocefalia; c) dismorfismos faciais como fronte alta, com estreitamento bitemporal, hipoplasia das cristas supraorbitárias, inclinação para baixo das fendas palpebrais, ponte nasal deprimida e orelhas posteriorizadas com hélices proeminentes; d) anomalias ectodérmicas, com cabelos esparsos e quebradiços, encaracolados, sobrancelhas esparsas e lesões hiperqueratóticas; e) cardiopatia congênita; e f) esplenomegalia.

A **síndrome de Costello** (SC) caracteriza-se por macrocefalia relativa, cabelos encaracolados, dismorfismos faciais, papilomas periorificiais, hiperelasticidade da pele das mãos e dos pés, pregas palmares e plantares profundas, tonalidade mais escura da pele e déficit intelectual (Costello, 1977,1996). As anomalias cardiovasculares mais comuns na doença incluem a comunicação interventricular, a estenose pulmonar valvar e a miocardiopatia hipertrófica (Siwik *et al.*, 1998).

A **síndrome da neurofibromatose-síndrome de Noonan** (NFSN), caracterizada por manifestações clínicas tanto da neurofibromatose tipo 1 (NF1) quanto da SN. Os principais achados da NF1 incluem: lesões cutâneas hiperpigmentadas, como as manchas café com leite (CAL, *café au lait*) e as efélides axilares e em região inguinal, neurofibromas cutâneos e plexiforme, hamartomas na íris (nódulos de Lisch), glioma do nervo óptico, anomalias esqueléticas específicas como a displasia da asa do esfenoide e o encurvamento dos ossos longos, com ou sem pseudoartrose (Jett *et al.*, 2010).

A **síndrome de Noonan com manchas lentiginosas/ síndrome de LEOPARD** (SNML/ SL) é uma doença autossômica dominante, cujo acrônimo define suas principais características clínicas: manchas lentiginosas, anormalidades eletrocardiográficas, hipertelorismo ocular, estenose pulmonar, anormalidade de genitália, retardo de crescimento e surdez. Para o diagnóstico clínico da síndrome, Voron *et al.* (1976) estabeleceram critérios diagnósticos que incluem a presença de manchas lentiginosas associadas a duas outras características clínicas ou a presença de um parente de primeiro grau com essas manchas, associada a outros três achados.

A **síndrome de Noonan-like com perda de cabelos anágenos** (SNL-PCA) foi recentemente considerada como uma síndrome distinta da SN. Nos achados clínicos nota-se uma redução do crescimento, frequentemente associada à deficiência de GH, maior déficit cognitivo, displasia da valva mitral e defeitos de septo, voz anazalada e anomalias de cabelo (cabelo fácil de arrancar, esparso, fino, com crescimento lento na fase anágena), diferente dos cabelos encaracolados frequentemente observados na SN. Até o momento, esta síndrome está restritamente associada à mutação p.S2G no gene *SHOC2*.

A **síndrome de Noonan-like com leucemia mielomonocítica juvenil** (SNL-LMMJ) foi recentemente considerada como uma síndrome distinta da SN. Relativamente, os achados clínicos incluem atraso variável no desenvolvimento e crescimento, dismorfismos faciais e manchas CAL. Pacientes com esta síndrome possuem predisposição a desenvolver LMMJ nos primeiros meses de vida. Até o momento, esta síndrome está restritamente associada à mutações no gene *CBL*.

### 1.1.7. Estudo Molecular nas síndromes de Noonan e síndromes Noonan-like

O primeiro gene responsável pela síndrome de Noonan – o gene *PTPN11*, que codifica a proteína SHP2 – foi identificado em 2001 (Tartaglia *et al.*). Em 2005, descobriu-se que o gene *HRAS*, pertencente à mesma via de sinalização do gene *PTPN11*, era responsável por grande parte dos casos de síndrome de Costello (Aoki *et al.*, 2005). Este fato sugeriu que outros genes também pertencentes à via RAS/MAPK poderiam estar envolvidos nas síndromes de Noonan e Noonan-like.

Em 2006, Schubbert *et al.* realizaram um estudo em 174 pacientes com SN e 12 com síndrome CFC – que não apresentavam mutações no gene *PTPN11* – e encontraram mutações no gene *KRAS.* Este gene, além de também fazer parte da via de sinalização RAS/MAPK, pertence à família de oncogenes *RAS*, cujos membros clássicos, além deste gene, incluem *HRAS* e *NRAS*. Estudos demonstram que mutações somáticas nos genes desta família estão intimamente ligadas ao desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias, em tecidos como pulmão, tireóide, intestino, pâncreas e medula óssea (Bos, 1989).

O estudo continuado daqueles pacientes com SN ainda sem o encontro de mutação culminou, na associação dos genes *SOS1* (Zenker *et al.*, 2007b) e *RAF1* (Razzaque *et al.*, 2007), seguidos das recentes associações dos genes *SHOC2* (Cordeddu *et al.*, 2009) e *CBL* (Martinelli *et al.*, 2010).

O estudo molecular na SN é complexo, dado o envolvimento destes vários genes, todos eles pertencentes à via de sinalização RAS/MAPK (Figura 1; Tabela 3). Em geral, os genes já associados apresentam mutações *missense* que levam a um ganho de função. A via

RAS/MAPK controla diversas atividades celulares, como: a proliferação, a diferenciação e a morte celular. Apesar de não ser um achado comum, a duplicação cromossômica envolvendo a região que contém o gene *PTPN11* já foi descrita em três casos com suspeita de SN, nenhum deles com o encontro de mutação nos genes da via RAS/MAPK (Doco-Fenzy *et al.*, 2006; John M. Graham *et al.*, 2009; Shchelochkov *et al.*, 2008).

O envolvimento de genes da via RAS/MAPK também foi demonstrado para as SNL (Figura 1; Tabela 3). Devido a este fato, novas denominações foram sugeridas, como por exemplo: *Síndromes* RAS/MAPK (Aoki *et al.*, 2008) e RASopatias (Tidyman *et al.*, 2009). O desenvolvimento de doenças associadas a mutações na via RAS/MAPK compartilham características fenotípicas que incluem anormalidades faciais, defeitos cardíacos, comprometimento do crescimento e desenvolvimento (Schubbert *et al.*, 2007).

Além das SN e SNL, outras síndromes também estão associadas a mutações nos genes da via RAS/MAPK (mitogen-activated protein kinase), como: neurofibromatose tipo I, fibromatose gengival hereditária tipo 1, síndrome da malformação capilar-malformação arteriovenosa, doença linfoproliferativa auto-imune e síndrome de Legius (Tidyman *et al.*, 2009).

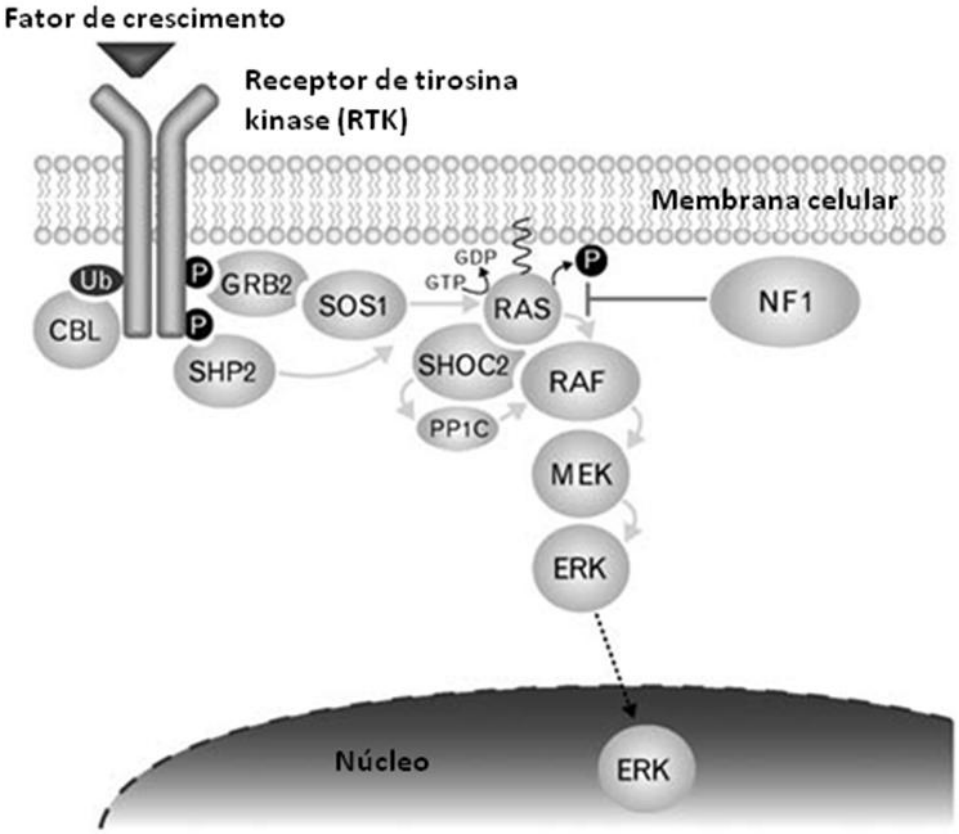
Embora uma grande porcentagem dos casos com SN e SNL seja esporádica, alguns pacientes apresentam uma mutação herdada de um dos genitores afetado (casos familiais). Entretanto, as características faciais mudam com o passar dos anos, podendo ser mais sutil nos adultos. O estudo molecular dos pais de um afetado permite confirmar o diagnóstico clínico e possibilita estabelecer o risco de recorrência para futuras gestações de forma adequada, uma vez que se um dos genitores for portador da mutação, o risco de recorrência passa de 1% para 50%. Recentemente houve a descrição de recorrência na SN pela presença de mosaicismo gonadal, o qual pode aumentar o risco de recorrência para o casal em questão. Pelo fato de ser um evento raro, o risco empírico de recorrência da SN em decorrência deste mecanismo é, provavelmente, menor que 1%. A informação durante o aconselhamento genético permitirá ao casal estabelecer de forma mais consciente o futuro planejamento familiar (Elalaoui *et al.*, 2010).

#### 1.1.7.1. Via RAS/MAPK

Conforme demonstrado na Figura 1, a via de sinalização RAS/MAPK se inicia através da ligação de um fator de crescimento ao receptor na membrana plasmática (receptor de tirosina quinase - RTK) resultando na ativação de complexos receptores, que contém alguns adaptadores (Shc, Grb2, Gab e SHP-2). Estas proteínas recrutam *SOS1* (fator trocador de guanina – GEF), que estimula a dissociação de GDP da proteína RAS (ligada à membrana). Devido à alta concentração de GTP citoplasmática, RAS liga-se a GTP, tornando-se ativa. RAS-GTP pode ativar diversas vias. A via RAS/RAF/*MEK*/ERK, além de ser uma via RAS/MAPK clássica, também está envolvida com a SN e as SNL. A neurofibromina (proteína ativadora de GTPase – GAP) é capaz de converter RAS-GTP em RAS-GDP, interrompendo a sinalização. A proteína *SHOC2* atua como modulador positivo, no nível de interação de RAS-RAF. A proteína CBL promove a ligação de ubiquitina (Ub) que é capaz de reconhecer substâncias tirosino-fosforiladas e, assim, modular a transdução do sinal mediada pelo RTK.

A sobreposição fenotípica da SN com as diversas síndromes Noonan-like pode ser entendida a partir do envolvimento dos diferentes genes nesta mesma via de sinalização. A Tabela 3 apresenta os genes da via RAS/MAPK que estão envolvidos nas síndromes de Noonan e Noonan-like.

**Figura 1** – O diagrama esquemático mostra a via de sinalização RAS/MAPK, onde somente a via Raf-MEK-ERK é ilustrada




A transdução do sinal se inicia através da ativação de um receptor de tirosina quinase (RTK), quando ligada a um fator de crescimento. Esta ligação promove o recrutamento de proteínas adaptadoras que funcionam como um fator trocador de guanina (como o gene *SOS1*), que ativa RAS facilitando a troca de GDP por GTP. A ligação de um GTP a RAS pode iniciar uma ativação da cascata de proteínas kinases ativadoras de mitose (MAPK), RAF, MEK e kinases reguladoras do sinal extracelular (ERK). A restituição da forma inativa de RAS é alcançada por hidrólise de GTP para GDP através da atividade intrínseca da GTPase do RAS, que é aumentada pela atividade de GTPase de proteínas , como a Neurofibromina (NF1). Desse modo, NF1 age como um regulador negativo da sinalização de RAS. *SHOC2* é um modulador positivo, no nível de interação de RAS-RAF. A proteína CBL promove a ligação de ubiquitina (Ub) que é capaz de reconhecer substâncias tirosino-fosforiladas e, assim, modular a transdução do sinal mediada pelo RTK. Traduzido e modificado de Zenker *et al.* (2011)

**Tabela 3 -** Genes da via RAS/MAPK já associados à síndrome de Noonan e às síndromes Noonan-like

| Síndrome | Lócus | Gene Mutado | CDS | *OMIM* | (%) | Referência |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SN | 12q24.1 | *PTPN11* | 15 | *176876* | 29-60 | (Musante *et al.*, 2003; Zenker *et al.*, 2004) |
| | 2p22.1 | *SOS1* | 23 | *182530* | 17*-28* | (Tartaglia *et al.*, 2007; Zenker *et al.*, 2007b) |
| | 3p25.1 | *RAF1* | 16 | *164760* | 9**-33** | (Pandit *et al.*, 2007; Razzaque *et al.*, 2007) |
| | 12p12.1 | *KRAS* | 5 | *190070* | 2*-6** | (Carta *et al.*, 2006; Nava *et al.*, 2007) |
| | 15q22.31 | *MEK1* | 11 | *176872* | 4** | (Nava *et al.*, 2007) |
| | 7q34 | *BRAF* | 18 | *164757* | 2*** | (Sarkozy *et al.*, 2009) |
| | 1p13.2 | *NRAS* | 4 | *164790* | <0,5*** | (Cirstea *et al.*, 2010) |
| CFC | 7q34 | *BRAF* | 18 | *164757* | 78 | (Rodriguez-Viciana *et al.*, 2006) |
| | 15q22.31 | *MEK1* | 11 | *176872* | 9 | (Rodriguez-Viciana *et al.*, 2006) |
| | 19p13.3 | *MEK2* | 11 | *601263* | 4 | (Rodriguez-Viciana *et al.*, 2006) |
| | 12p12.1 | *KRAS* | 5 | *190070* | 3-10 | (Nava *et al.*, 2007; Zenker *et al.*, 2007a) |
| SC | 11p15.5 | *HRAS* | 5 | *190020* | 92 | (Aoki *et al.*, 2005) |
| | 12p12.1 | *KRAS* | 5 | *190070* | 7 | (Zenker *et al.*, 2007a) |
| NFSN | 17q11.2 | *NF1* | 58 | *613113* | 94 | (De Luca *et al.*, 2005) |
| | 12q24.1 | *PTPN11* | 15 | *176876* | <1 | (Bertola *et al.*, 2005; Thiel *et al.*, 2009) |
| SNML/SL | 12q24.1 | *PTPN11* | 15 | *176876* | 91 | (Digilio *et al.*, 2002) |
| | 3p25.1 | *RAF1* | 16 | *164760* | 3 | (Pandit *et al.*, 2007) |
| | 7q34 | *BRAF* | 18 | *164757* | 1 | (Seishima *et al.*, 2007) |
| SNL-PCA | 10q25 | *SHOC2* | 8 | *602775* | 4%*** | (Cordeddu *et al.*, 2009) |
| SNL-LMMJ | 11q23.3 | *CBL* | 16 | *165360* | 1%*** | (Martinelli *et al.*, 2010) |

CDS, éxons codificantes; SN, síndrome de Noonan; SNL-PCA, síndrome de Noonan-like com perda de cabelos anágenos; SNL-LMMJ, síndrome de Noonan-like com leucemia mielomonocítica juvenil; SC, síndrome de Costello; CFC, síndrome cardio-facio-cutânea; SNML/SL, síndrome de Noonan com manchas lentiginosas; NFSN, neurofibromatose-síndrome de Noonan; *em pacientes sem mutação no gene *PTPN11*; **em pacientes sem mutação nos genes *PTPN11* e *SOS1;* ***em pacientes sem mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1* e *RAF1*

### 1.1.8. Correlação genótipo-fenótipo

A presença de diferentes genes na SN dificulta a confirmação diagnóstica, o que torna imprescindível a tentativa de estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo. Por hora, sabe-se que:

Para o gene *PTPN11*: pacientes com SN e mutação neste gene apresentam maior frequência de EPV e de baixa estatura, e menor frequência de MIOCH (Tartaglia *et al.*, 2002a; Zenker *et al.*, 2004). Pacientes com a mutação p.N308D apresentam menor necessidade de educação especial (Tartaglia *et al.*, 2002b). Também foi observada maior incidência de defeitos septais em pacientes com SN e mutação no éxon 3 deste gene (Sarkozy *et al.*, 2003).

Para o gene *SOS1*: pacientes com SN e mutação neste gene apresentam maior envolvimento ectodérmico, maior frequência de ptose, menor frequência de baixa estatura e desenvolvimento cognitivo normal (Tartaglia *et al.*, 2007; Zenker *et al.*, 2007b).

Para o gene *RAF1*: pacientes com SN e mutação neste gene apresentam maior frequência de MIOCH e baixa estatura, e menor frequência de EPV (Kobayashi *et al.*, 2010; Pandit *et al.*, 2007).

Para o gene *KRAS*: pacientes com SN e mutação neste gene apresentam maior frequência e gravidade de déficit intelectual, além de menor envolvimento ectodérmico em pacientes com CFC (Zenker *et al.*, 2007a).

Para o gene *SHOC2*: pacientes com SN e mutação neste gene apresentam anormalidades de cabelo, como crescimento lento, cabelos finos e perda de cabelos anágenos (Cordeddu *et al.*, 2009).

### 1.1.8.2. Tumores nas RASopatias

O fato de vários genes da via RAS/MAPK ser sabidamente oncogênicos quando presentes em mutações somáticas, alerta para a possibilidade dos indivíduos afetados pela SN e SNL apresentarem um risco aumentado de desenvolverem uma neoplasia.

Já é bem estabelecida a relação entre mutações somáticas e o desenvolvimento de neoplasias. O gene *PTPN11*, por exemplo, responsável por até 91% dos casos de LEOPARD e 70% dos casos de SN (Digilio *et al.*, 2002; Zenker *et al.*, 2004), está envolvido em 35% dos pacientes com a leucemia mielomonocítiva juvenil (LMMJ) e, em uma menor porcentagem, com a leucemia linfocítica aguda (LLA) e a leucemia mielocítica aguda (LMA) (Kratz *et al.*, 2005). O gene *BRAF* – principal gene responsável pela síndrome CFC (Rodriguez-Viciana *et al.*, 2006) – quando mutado apresenta uma incidência de formação de tumor de até 50% para alguns tipos de câncer (Schubbert *et al.*, 2007). Mutações somáticas envolvendo os genes *RAS*, especialmente o gene *KRAS*, também estão ligadas ao desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias – 20% a 30% dos casos (Chen *et al.*, 2006).

Porém, a relação entre mutações germinativas e a formação de neoplasias ainda não está bem definida. Até o momento, está bem definido que os pacientes com a síndrome de Costello e com mutações no gene *HRAS* apresentam um risco de 17% para desenvolvimento de uma neoplasia, especialmente neuroblastoma, rabdomiossarcoma e carcinoma de bexiga (Gripp, 2005). Pacientes com SN e SNL podem apresentar um crescimento anormal especialmente nos ossos da maxila e mandíbula – tumor de células gigantes (Tartaglia *et al.*, 2011) e aqueles com mutação, especialmente nos genes *PTPN11* e *CBL,* podem apresentar a leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) que, em geral, evolui com regressão espontânea (Loh *et al.*, 2004; Martinelli *et al.*, 2010; Tartaglia *et al.*, 2003). Recentemente, outro estudo avaliou a frequência de neoplasias e evidenciou que nestes pacientes – com SN e mutação no gene *PTPN11* – há um risco 3,5 vezes maior comparado a população normal. Como na SN há diferentes tipos de tumores descritos, tanto hematológicos como sólidos, por hora, não há indicação da realização de exames preventivos (Jongmans *et al.*, 2011).

# 2. OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

Este projeto visa estudar por sequenciamento os genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS, SHOC2*, *BRAF* e *HRAS* em pacientes com diagnóstico clínico de síndrome de Noonan (SN) e das síndromes Noonan-like (SNL) com o objetivo de:

(a) determinar a frequência de mutação nos diferentes genes em pacientes com SN e SNL;

(b) estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo com grandes repercussões no aconselhamento genético e prognóstico;

(c) estabelecer um fluxograma para o estudo molecular a partir dos *hotspots*;

(d) avaliar se a variabilidade fenotípica apresentada nos pacientes com SN pode ser explicada pela presença de mutações em mais de um gene da via RAS/MAPK.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

# 3. MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, onde o protocolo de estudo foi submetido ao comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), tendo sido aprovado (CAPPesq 0843/08). O consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes ou pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisa fossem iniciados.

Aos pacientes e/ou responsáveis legais foram explicados os objetivos do presente trabalho, assim como os requisitos necessários. Foi ainda informado aos mesmos que a participação neste trabalho é voluntária e que a recusa em participar não acarretaria em nenhum prejuízo de atendimento ao paciente e/ou a seus familiares nesta Instituição.

## 3.1. Casuística

Tratar-se de um estudo prospectivo em que foram avaliados pacientes afetados pelas SN e SNL em seguimento no Ambulatório de Genética Clínica do Instituto da Criança (ICr/HC/FMUSP), no Ambulatório de Cardiopatias Congênitas do Instituto do Coração (InCor/HC/FMUSP) e no Ambulatório de Endocrinologia do HC/FMUSP, em um total de 194 afetados: 152 com SN, 19 com CFC, 15 com NFSN, 4 com SC e 4 com SL. Do total de pacientes estudados, 116 eram do sexo masculino e 78 do sexo feminino. A idade variou entre 1a4m e 51 anos, com média de 14a3m, mediana de 12a6m, desvio padrão de 8a8m e coeficiente de variação de 61%. A recorrência da síndrome em um parente de primeiro grau foi observada em 26 casos (13% de casos familiais), sendo quatro afetados pela NFSN, um

por SL e o restante pela SN. Em parte da casuística - 124 pacientes - o sequenciamento dos genes *PTPN11* e *KRAS* havia sido previamente realizado (Bertola *et al.*, 2006; Brasil *et al.*, 2010).

Para a casuística com síndrome de Noonan, só foram incluídos neste estudo aqueles que preenchiam os critérios clínicos de van der Burgt *et al.* (1994), de acordo com a Tabela 1.

## 3.2. Métodos

Os dados clínicos e alguns dados laboratoriais foram obtidos através de um protocolo empregado no Ambulatório de Genética do Instituto da Criança – ICr/HC/FMUSP, que compreende:

- Anamnese, Genealogia;
- Exame físico completo do propósito e dos pais;
- Estudo cardiológico (eletrocardiograma e ecocardiograma);
- Estudo cromosômico com banda G do sangue periférico;
- Exames radiológicos: RX de punhos para idade óssea e de coluna; US de abdome total ecocardiograma
- Avaliação oftalmológica
- Avaliação hematológica

A anamese e o exame físico dos pacientes foram realizados por um médico geneticista da Unidade de Genética do ICr/HC/FMUSP. Os demais exames e avaliações foram realizados no Complexo do Hospital das Clínicas da FMUSP, salvo os raros casos em que o paciente já apresentava exames realizados em outros serviços.

O estudo cromossômico com banda G do sangue periférico foi realizado em todos os pacientes para afastar a possibilidade de aberrações cromossômicas. Só foram incluídos neste estudo os pacientes com resultado normal para este exame.

O estudo molecular foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor/HC/FMUSP) e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 (HC/FMUSP), devidamente equipados, e que já apresentam experiência na realização dos seguintes procedimentos: extração de DNA, reação em cadeia de polimerase (PCR), purificação, sequenciamento direto e estudo de grupo controle (quando necessário).

Inicialmente foi realizado o estudo molecular no propósito. No encontro de uma alteração, os pais foram convocados para pesquisa da mesma a fim de estabelecer se a mesma ocorreu *de novo* ou foi herdada.

### 3.2.1. Extração de DNA

Para a realização do teste molecular, uma amostra de 4 ml de sangue foi coletada de uma veia periférica e colocada em tubo contendo EDTA. A extração do DNA foi feita através da modificação do método de Miller *et al.* (1988) conforme protocolo abaixo.

O sangue total foi transferido para um tubo de 15 ml. A este tubo foi adicionado 10 ml de tampão para lise das hemácias (tampão A = 144 mM $NH_4Cl$ + 1 mM $NH_4CO_3$), a temperatura ambiente (TA). Após vórtex, o tubo foi mantido a TA por 10 minutos e depois centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido com 10 ml do tampão A a 4 ºC. Após vórtex, o tubo foi novamente mantido a TA por 10 minutos e depois centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Mais uma vez, o sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido em 1,5 ml de tampão (tampão B = 10 mM Tris pH 8.0 + 400 mM NaCl + 2mM EDTA pH 8.0) e 100 ul de SDS a 10%. O tubo foi homogenizado por inversão, foi adicionado 250 ul de solução contendo proteinase K (tampão C = 1% SDS + 1 M EDTA pH 8.0 + 125 ug/ml proteinase K). O tubo então foi vortexado e mantido a 37$^{o}$C por 12 a 18 horas. Após incubação foi adicionado 500 ul de solução contendo 6 M NaCl (tampão D). O tubo foi vortexado por 1 minuto e centrifugado a

3.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 15 ml, ao qual foi adicionado 3 ml de etanol a 100% (mantido a -20 $^{o}$C). Após homogenizar o tubo por inversão, foi observada a formação do enovelado de DNA ("medusa"). Este enovelado foi transferido para um tubo de 1,5 ml contendo 1 ml de etanol 70% (mantido a -20 ºC) e centrifugado a 4$^{o}$C e 13.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo invertido foi deixado a TA por 18 a 24 horas (*over night;* ON). O pellet seco (DNA) foi hidratado com 1 ml TE 1x (10mM Tris-HCl pH 8.0 + 1 mM EDTA ph 8.0) e deixado a TA por mais 18 a 24 horas. Após vórtex, as amostras foram dosadas e diluídas para 10 ng/ul.

### 3.2.2. Reação em Cadeia de Polimerase

Os 194 pacientes desta casuística foram estudados do ponto de vista molecular, da seguinte maneira: *PTPN11* (14 éxons codificantes), *SOS1* (23 éxons codificantes), *RAF1* (éxons *hotspots* 7, 14 e 17), *KRAS* (5 éxons codificantes) e *SHOC2* (éxon *hotspot* 2) nas SN e SLN, *BRAF* (éxons *hotspots* 6, 11, 12, 14, 15 e 16) na síndrome CFC e *HRAS* (5 éxons codificantes) na síndrome de Costello. Portanto, para cada gene, todos os éxons codificantes foram sequenciados – com exceção dos genes *RAF1, SHOC2* e *BRAF*, nos quais foram estudados apenas os *hotspots*. O estudo molecular do gene *RAF1* foi realizado pela Dra. Alexsandra Christiane Malaquias de Moura Ribeiro sob orientação do Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, como parte da sua Tese de Doutorado (concluída em Maio de 2011). As sequências dos pares de primers utilizados encontram-se no Anexo I.

Para a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foram utilizados: PCR-buffer 1x (50 mM KCl + 2,5 mM $MgCl_2$ + 10 mM Ácido Tris-hidroclórico + 0,1% Triton X-100); 0,2 mM dNTPs; 2,25 mM $MgCl_2$; 5% DMSO; 0,2 uM de cada par de *primer*s (sense e anti-sense); 0,03 U Taq DNA polimerase; 10 ng de DNA; e água milli-Q em quantidade suficiente para 50 ul (para purificação em colunas = métodos 1 e 2) ou para 10 ul (para purificação enzimática = método 3). Os padrões do ciclo foram: 94 ºC por 5 minutos (denaturação inicial), 35 ciclos de 94 ºC por 30 segundos, temperatura de hibridização por 30 segundos, 72 ºC por 40 segundos, e extensão final a 72 ºC por 5 minutos.

Para comprovar se houve amplificação, parte dos produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio a 0,5 ng/ml. Após corrida, o gel foi observado em um transluminador com luz ultravioleta (UV).

### 3.2.3. Purificação

Após amplificação, os produtos da PCR foram purificados utilizando três diferentes métodos, dependendo da disposição de compra dos kits: (1) *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* – GE Healthcare Biosciences; (2) *E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit* – Omega Bio-tek; (3) *ExoSAP-IT®* - USB Corporation. O protocolo para purificação foi seguido conforme sugestão de cada fabricante.

### 3.2.4. Sequenciamento

Após a purificação, a reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit *Big Dye Terminator Sequencing (Applied Biosystems)*, o qual contém dideoxinocleotídios marcados com fluorocromos (bases terminadoras). Para uma reação com volume final de 12 ul foram utilizados: 2 ul da solução *Big Dye Terminator;* 2,4 ul do tampão *Save Money* 5x; 3 ul de DNA purificado; 1 ul de *primer* (F ou R) a 5 uM; e 3,6 ul de água Milli-Q. Os padrões do ciclo foram: 96 ºC por 3 minutos (denaturação inicial), 35 ciclos de 96 ºC por 15 segundos, 50 ºC por 10 segundos, 60 ºC por 4 minutos. Após ciclagem, os produtos foram imediatamente resfriados a 4 ºC. As amostras foram, então, precipitadas adicionando 80 ul de etanol 70% a TA. As amostras foram mantidas a TA por 15 minutos e depois centrifugadas a 4.000 rpm durante 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 120 ul de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi completamente descartado e as amostras aquecidas a 96 ºC por 2 minutos. Foram adicionados 2 ul de uma mistura contendo formamida e *loading buffer* na proporção de 4:1. Por fim, as amostras foram aquecidas a 96 ºC por 3 minutos e mantidas no gelo até aplicação.

Para corrida foi utilizado equipamento *ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem*). Para preparo do gel foram homogenoizados por 15 minutos: 9 gr de uréia; 2,5 ml de long ranger; 2,5 ml de tampão TBE 10x (890 mM Tris pH 8.0 + 890 mM Ácido Bórico pH 8.0 + 20 mM EDTA pH 8.0); e 13mL de água Milli-Q. Para polimerização do gel foram adicionados 125 ul de persulfato de amônia (APS) a 0,1 mg/ul e 17,5 ul de TEMED.

O resultado da corrida foi analisado em aparelho *ABI Prism - 977377* (*Perkin Elmer).* Para determinação dos genótipos as sequências foram lidas, manualmente (uma a uma), utilizando o programa *DNASTAR – SeqMan (Laser Gene)*.

### 3.2.5. Predição para o efeito das mutações ainda não descritas

Na tentativa de sugerir o efeito das alterações encontradas neste estudo e ainda não descritas na literatura (se tem ou não influência sobre o fenótipo, ou seja, se é patogênica ou benigna), utilizamos os seguintes critérios:

a) Rastreamento da presença da mutação em questão nos pais do probando, através do sequenciamento;

b) Estudo de predição do potencial impacto sobre a função ou estrutura da proteína: (1) para mutações *missense* utilizamos o *PolyPhen2* (Ramensky *et al.*, 2002) e o *SIFT* (Kumar *et al.*, 2009); (2) o *Mutation Taster* (Schwarz *et al.*, 2010) foi utilizado para inserção ou deleção, uma vez que as primeiras ferramentas não possuem predição para este tipo de alteração;

c) Análise comparativa da conservação dos aminoácidos entre o genoma humano e de outras diferentes espécies (*Fugu rubripes, Pan troglodytes, Gallus gallus, Xenopus tropicalis, Canis familiaris, Danio rerio* and *Trichoplax adhaerens*), através da ferramenta *VISTA Genome Browser* (Frazer *et al.*, 2004).

### 3.3. Análise Estatística

Como objetivo de realizar correlação genótipo-fenótipo, a casuística de pacientes com SN foi classificada conforme o gene envolvido. Para comparação das características clínicas e laboratoriais não-numéricas entre os diferentes genótipos foi utilizada a análise descritiva, o teste exato de *Fisher* (para amostras com até 20 dados) ou o teste do *Chi-quadrado* (para amostras com mais de 20 dados), conforme apropriado. Para toda análise estatística, foi considerado como estatisticamente significante um valor de $p < 0,05$.

# 4. RESULTADOS

# 4. RESULTADOS

## 4.1. Alterações encontradas

O estudo molecular nos 194 pacientes avaliados identificou alteração nos genes estudados em 102 deles. Resumo das alterações observadas encontra-se na Tabela 4. A listagem destas alterações por gene encontra-se nas Tabelas 5 a 9. O encontro de duas mutações em diferentes genes da via RAS/MAPK só ocorreu em um paciente com SN: p.N308D no gene *PTPN11* e p.R552G no gene *SOS1*.

**Tabela 4** – Distribuição das alterações encontradas

| Síndrome | *PTPN11* | *SOS1* | *RAF1* | *KRAS* | *SHOC2* | *BRAF* | *HRAS* | TOTAL pacientes com alteração |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **SN** | 52* | 13* | 7 | 5 | 3 | 4 | | 83* |
| **CFC** | | | | 1 | 2 | 8 | | 11 |
| **SC** | | 1 | | 1 | | | 1 | 3 |
| **NFSN** | 1** | | | | | | | 1 |
| **SL** | 4 | | | | | | | 4 |
| **TOTAL** | 57 | 14 | 7 | 7 | 5 | 12 | 1 | **102** |

SN, síndrome de Noonan; CFC, síndrome cardio-facio-cutânea; SC, síndrome de Costello; SL, síndrome de LEOPARD; NFSN, neurofibromatose-síndrome de Noonan. *Um paciente com SN apresentou mutação em mais de um gene da via RAS/MAPK – a mutação N308S no gene *PTPN11* e a mutação R552G no gene *SOS1.* **Esse paciente, previamente estudado, também apresentou uma mutação no gene *NF1* (Bertola *et al.*, 2005)

**Tabela 5** – Alterações encontradas no gene *PTPN11*

| *PTPN11* éxon | Nucleotídeo | Aminoácido | Pacientes n=57 | | Domínio protéico | Literatura |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | SN n=52 | SNL n=5 | | |
| 3 | c.179G>C | p.G60A | 1 | | N-SH2 | (Tartaglia *et al.*, 2002b) |
| 3 | c.182A>G | p.D61G | 3 | | N-SH2 | (Tartaglia *et al.*, 2001) |
| 3 | c.184T>G | p.Y62D | 1 | | N-SH2 | (Tartaglia *et al.*, 2002b) |
| 3 | c.188A>G | p.Y63C | 5 | | N-SH2 | (Tartaglia *et al.*, 2001) |
| 3 | c.205G>C | p.E69Q | 1 | | N-SH2 | (Musante *et al.*, 2003) |
| 3 | c.206A>T | p.E69V | 1 | | N-SH2 | (Pierpont *et al.*, 2010) |
| 3 | c.218C>T | p.T73I | 1 | | N-SH2 | (Tartaglia *et al.*, 2002b) |
| 3 | c.236A>G | p.Q79R | 3 | | N-SH2 | (Tartaglia *et al.*, 2001) |
| 3 | c.317A>C | p.D106A | 1 | | N-SH2/ C-SH2 linker | (Tartaglia *et al.*, 2002b) |
| 4 | c.417G>C c.417G>T | p.E139D | 2 | | C-SH2 | (Tartaglia *et al.*, 2002b) |
| 7 | c.836A>G | p.Y279C | 1 | 4 (SL) | PTP | (Tartaglia *et al.*, 2002b) |
| 7 | c.844A>G | p.I282V | 1 | | PTP | (Tartaglia *et al.*, 2001) |
| 8 | c.854T>C | p.F285S | 2 | | PTP | (Tartaglia *et al.*, 2002b) |
| 8 | c.922A>G | p.N308D | 12 | | PTP | (Tartaglia *et al.*, 2001) |
| 8 | c.923A>G | p.N308S | 6* | | PTP | (Tartaglia *et al.*, 2002b) |
| 8 | c.923A>C | p.N308T | 1 | | PTP | (Pierpont *et al.*, 2010) |
| 12 | c.1403C>T | p.T468M | 1 | | PTP | (Digilio *et al.*, 2002) |
| 13 | c.1471C>T | p.P491S | 1 | | PTP | (Zenker *et al.*, 2004) |
| 13 | c.1472C>A | p.P491H | 1 | | PTP | (Bertola *et al.*, 2006) |
| 13 | c.1504T>G | p.S502A | 1 | | PTP | (Kratz *et al.*, 2005) |
| 13 | c.1505C>T | p.S502L | 2 | | PTP | (Bertola *et al.*, 2006) |
| 13 | c.1510A>G | p.M504V | 3 | | PTP | (Tartaglia *et al.*, 2001) |
| 13 | c.1529A>C | p.Q510P | 1 | | PTP | (Keren *et al.*, 2004) |
| 13 | c.1529A>G | p.Q510R | | 1 (NFSN)** | PTP | (Bertola *et al.*, 2005) |

SN, síndrome de Noonan; SNL, síndromes Noonan-like; SL, síndrome de LEOPARD; NFSN, neurofibromatose-síndrome de Noonan. *Um paciente com SN apresentou mutação em mais de um gene da via RAS/MAPK – a mutação N308S no gene *PTPN11* e a mutação R552G no gene *SOS1*. **Esse paciente, previamente estudado, também apresentou a mutação p.L844R no gene *NF1* (Bertola *et al.*, 2005). Parte da casuística já havia sido avaliada para o este gene (Bertola *et al.*, 2006; Brasil *et al.*, 2010)

**Tabela 6** – Alterações encontradas no gene *SOS1*

| ***SOS1* éxon** | **Nucleotídeo** | **Aminoácido** | **Pacientes n=13** | | **Domínio protéico** | **Literatura** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | **SN n=13** | **SC n=1** | | |
| 6 | c.797C>A | p.T266K | 1 | | DH | (Roberts *et al.*, 2007) |
| 6 | c.806T>C | p.M269T | 2 | 1 | DH | (Zenker *et al.*, 2007b) |
| 6 | c.806T>G | p.M269R | 2 | | DH | (Tartaglia *et al.*, 2007) |
| 10 | c.1654A>G | p.R552G | 2* | | PH-REM linker | (Tartaglia *et al.*, 2007) |
| 10 | c.1655G>C | p.R552T | 1 | | PH-REM linker | (Beneteau *et al.*, 2009) |
| 10 | c.1656G>T<br>c.1656G>C | p.R552S | 2 | | PH-REM linker | (Tartaglia *et al.*, 2007)<br>(Beneteau *et al.*, 2009) |
| 11 | c.1861_1862insATC | p.621_622insH | 1 | | REM | não descrita |
| 14 | c.2183A>T | p.K728I | 1 | | Cdc25 | (Jongmans *et al.*, 2010) |
| 16 | c.2536G>A | p.E846K | 1 | | Cdc25 | (Tartaglia *et al.*, 2007) |

SN, síndrome de Noonan; SC, síndrome de Costello. *Um paciente com SN apresentou mutação em mais de um gene da via RAS/MAPK – a mutação N308S no gene *PTPN11* e a mutação R552G no gene *SOS1*

**Tabela 7** – Alterações encontradas no gene *RAF1*

| ***RAF1* éxon** | **Nucleotídeo** | **Aminoácido** | **SN n=7** | **Domínio protéico** | **Literatura** |
|---|---|---|---|---|---|
| 7 | c.770C>T | p.S257L | 5 | CR2 | (Razzaque *et al.*, 2007) |
| 7 | 781C>T | p.P261S | 2 | CR2 | (Razzaque *et al.*, 2007) |

SN, síndrome de Noonan

**Tabela 8** – Alterações encontradas no gene *KRAS*

| ***KRAS* éxon** | **Nucleotídeo** | **Aminoácido** | **Pacientes n=7** | | **Domínio protéico** | **Literatura** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | **SN n=5** | **SNL n=2** | | |
| 2 | c.13A>G | p.K5E | | 1 (SC) | P loop | (Bertola *et al.*, 2007) |
| 2 | c.40G>A | p.V14I | 3 | | P loop | (Schubbert *et al.*, 2006) |
| 3 | c.214A>C | p.M72L | 1 | | alfa-2 helix | não descrita |
| 6 | c.461A>T | p.D153V | | 1 (CFC)* | alfa-5 helix | (Schubbert *et al.*, 2006) |
| 6 | c.531_533delGAA | p.K176Del | 1 | | HVR | não descrita |

SN, síndrome de Noonan; SNL, síndromes Noonan-like; SC, síndrome de Costello; CFC, síndrome Cardio-facio-cutânea; HVR, hipervariable region, região hipervariável. *Paciente já descrito previamente (Brasil *et al.*, 2010)

**Tabela 9** – Alterações encontradas no gene *BRAF*

| *BRAF* éxon | Nucleotídeo | Aminoácido | Pacientes n=12 | | Domínio protéico | Literatura |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | SN n=4 | CFC n=8 | | |
| 6 | c.736G>C | p.A246P | 1 | | CR1 | (Niihori *et al.*, 2006) |
| 11 | c.1391G>A | p.G464E | 1 | | CR3 | não descrita |
| 11 | c.1408A>C | p.T470P | | 1 | CR3 | não descrita |
| 12 | c.1501G>A | p.E501K | | 2 | CR3 | (Niihori *et al.*, 2006) |
| 12 | c.1502A>G | p.E501G | | 3 | CR3 | (Niihori *et al.*, 2006) |
| 14 | c.1741A>G | p.N581D | | 1 | CR3 | (Niihori *et al.*, 2006) |
| 15 | c.1802A>T | p.K601I | 1 | 1 | CR3 | não descrita |
| 16 | c.1877G>A | p.R626K | 1 | | CR3 | não descrita |

SN, síndrome de Noonan; SNL, síndromes Noonan-like; HVR, hipervariable region (região hipervariável)

O estudo do gene *SHOC2* identificou cinco paciente com alteração: quatro pacientes (dois com SN e dois com CFC) com a troca c.4A>G, que caracteriza a mutação p.S2G já descrita previamente (Cordeddu *et al.*, 2009); e um paciente com SN e a substituição c.89C>G, responsável pela mutação p.A30G, ainda não descrita previamente.

Foi encontrada apenas uma alteração no gene *HRAS* em um paciente com SC: p.G12S (c.34G>A), já descrita previamente (Aoki *et al.*, 2005).

## 4.2. Predição do efeito das mutações ainda não descritas

Segue abaixo a avaliação de alguns critérios de predição para o potencial impacto das alterações não descritas encontradas. Resumo desta avaliação encontra-se na Tabela 10.

**Gene *SOS1***

A alteração p.621_622insH no gene *SOS1*, não gera uma proteína truncada, adiciona apenas um aminoácido (H; histidina) à sequência normal da proteína. Esta alteração não foi encontrada em nenhum dos genitores fenotipicamente normais e, pela predição no *Mutation Taster,* não é responsável pelo fenótipo. Os dados obtidos ainda não asseguram classificar esta alteração como patogênica ou não.

**Gene *KRAS***

As duas alterações não descritas encontradas no gene *KRAS* foram consideradas patogênicas: (1) a mutação p.M72L, pois apesar do *PolyPhen* ter predição desta alteração ser benigna, o *SIFT* prediz dano e a alteração segrega nos afetados dentro da família; há também descrição de uma mutação envolvendo o mesmo resíduo, a p.M72I, como evento somático em câncer: neoplasma linfóide e mieloma em células do plasma (Forbes *et al.*, 2011); (2) a alteração p.K176Del, não segrega nos genitores fenotipicamente normais, deleta um aminoácido (K; lisina) na sequência normal da proteína, o resíduo envolvido é conservado e o *Mutation Taster* considera-a como causadora da doença.

**Gene *BRAF***

Apesar da mutação p.G464E ainda não ser descrita, em pacientes com SN ou SNL, já foi descrita como mutação somática em câncer: carcinoma cortical na glândula suprarenal, carcinoma e adenocarcinoma no intestino grosso, carcinoma ovariano e no trato superior aero digestivo (boca, alvéolos) (Forbes *et al.*, 2011). Também há descrição de uma mutação envolvendo o mesmo resíduo (p.G464R) em um paciente com CFC (Nava *et al.*, 2007). Além disso, a alteração não descrita encontrada segrega no parente afetado, tem predição de causar dano a proteína (tanto pelo *PolyPhen* como pelo *SIFT*), e tem seu resíduo conservado entre as espécies, sendo, portanto, considerada patogênica.

A mutação p.T470P no gene *BRAF*, foi considerada patogênica, pois não foi identificada nos genitores fenotipicamente normais, possui predição de dano a proteína (tanto pelo *PolyPhen* como pelo *SIFT*) e envolve um aminoácido que é conservado entre as espécies.

A mutação p.K601I no gene *BRAF* encontrada em dois pacientes (um com SN e o outro com CFC) apresenta predição de provável dano a proteína (tanto pelo *PolyPhen* como pelo *SIFT*) e o resíduo envolvido é conservado entre as espécies. A mesma mutação, porém como um evento somático, já foi relacionada ao desenvolvimento de câncer: melanoma na pele, carcinoma e adenoma na tireóide, e carcinoma, adenocarcinoma e adenoma no intestino grosso (Forbes *et al.*, 2011). Além disso, há descrição de mutação envolvendo o mesmo resíduo (p.K601Q) em dois pacientes com CFC (Sarkozy *et al.*, 2009). Os genitores são fenotipicamente normais e não apresentaram a alteração. Sendo assim, a mutação foi considerada como patogênica.

A mutação p.R626K no gene *BRAF* possui predição de ser benigna pelo *PolyPhen*, porém o *SIFT* prediz alteração da função da proteína e o resíduo envolvido é conservado entre as espécies. Até o momento, não tivemos acesso aos genitores para rastreamento desta alteração. Os dados obtidos ainda não asseguram classificar esta alteração como patogênica ou não.

**Gene *SHOC2***

Para a alteração p.A30G não descrita encontrada no gene *SHOC2*, houve segregação em um dos pais aparentemente sem características sugestivas da SN, a predição de ambas as ferramentas indicou que esta seja benigna/tolerada e, apesar do resíduo envolvido ser conservado entre as espécies, esta alteração foi considerada como não patogênica.

**Tabela 10** – Predição do efeito para as alterações não descritas encontradas neste estudo

| Gene | *SOS1* | *KRAS* | *KRAS* | *BRAF* | *BRAF* | *BRAF* | *BRAF* | *SHOC2* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alteração (aa) | p.621_622insH | p.M72L | p.K176delI | p.G464E | p.T470P | p.K601I | R626K | p.A30G |
| Alteração (nt) | c.1861_1862insATC | c.214A>C | c.531_533delGAA | c.1391G>A | c.1408A>C | c.1802A>T | c.1877G>A | c.89C>G |
| Familial | não | sim | não | sim | não | não | não | não |
| Pais com alteração | não | mãe e irmã | não | mãe | não | não | não avaliados | mãe |
| *SIFT* | --- | dano | --- | dano | dano | dano | dano | benigna |
| *PolyPhen* | --- | benigna | --- | dano | dano | dano | benigna | benigna |
| *Mutation Taster* | benigna | --- | dano | --- | --- | --- | --- | --- |
| Resíduo conservado | --- | sim | sim | sim | sim | sim | sim | sim |
| Resíduo (literatura) | --- | --- | --- | p.G464R - CFC[a] | --- | p.K601Q - CFC[b] | --- | --- |
| Sugestão | ? | Patogênica | Patogênica | Patogênica | Patogênica | Patogênica | ? | Benigna |
| Câncer (COSMIC) | --- | M72I[1] | --- | sim[2] | --- | sim[3] | --- | --- |

(aa) aminoácido; (nt) nucleotídeo; (COSMIC) Catalog of Somatic Mutation in Cancer, Catálogo de Mutações Somática em Câncer; [a](Nava *et al.*, 2007); [b](Sarkozy *et al.*, 2009); [1]mieloma múltiplo; [2]carcinoma cortical na glândula adrenal, carcinoma e adenocarcinoma no intestino grosso, carcinoma ovariano, carcinoma no trato superior aero digestivo; [3]melanoma. Ferramentas de bioinformática: *SIFT* (Kumar *et al.*, 2009), *PolyPhen2* (Ramensky *et al.*, 2002) e *Mutation Taster* (Schwarz *et al.*, 2010)

## 4.3. Mutações encontradas

Resumo das mutações encontradas – incluindo as mutações já descritas e as alterações não descritas com sugestão de efeito patogênico – e suas respectivas frequências comparadas com as da literatura encontram-se na Tabela 11.

Dos 99 probandos com mutação, 15 (15%) são casos familiais. A identificação da alteração do paciente no parente afetado foi possível em todos os 14 casos avaliados. Em um caso o parente clinicamente afetado não foi avaliado quanto do ponto de vista molecular. Para os oito casos familiais com SN e mutação no gene *PTPN11*, não houve diferença significante na avaliação clínica dos familiares afetados, levando-se em consideração a baixa estatura, a face típica, a presença de cardiopatia e a criptorquidia nos meninos.

**Tabela 11** – Distribuição e frequência das mutações encontradas

| Síndrome | *PTPN11* | *SOS1* | *RAF1* | *KRAS* | *SHOC2* | *BRAF* | *HRAS* | TOTAL pacientes com mutação |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **SN** | 52* | 12* | 7 | 5 | 2 | 3 | | 80* |
| % (% Lit.) | 34 (29-60) | 12 (17-28) | 7 (9-33) | 5 (2-6) | 2 (4) | 3 (2) | | 53 (61) |
| **CFC** | | | | 1 | 2 | 8 | | 11 |
| % (% Lit.) | | | | 5 (3-10) | 11 (?) | 42 (78) | | 58 (60-90) |
| **SC** | | 1 | | 1 | | | 1 | 3 |
| % (% Lit.) | | 25 (?) | | 25 (7) | | | 25 (92) | 75 (83-100) |
| **NFSN** | 1** | | | | | | | 1 |
| % (% Lit.) | 7 (< 1) | | | | | | | 7 (94) |
| **SL** | 4 | | | | | | | 4 |
| % (% Lit.) | 100 (91) | | | | | | | 100 (91) |
| **TOTAL** | 57 | 13 | 7 | 7 | 4 | 11 | 1 | **99** |

SN, síndrome de Noonan; CFC, síndrome cardio-facio-cutânea; SC, síndrome de Costello; NFSN, neurofibromatose-síndrome de Noonan; SL, síndrome de LEOPARD. Seguindo os padrões da literatura, a frequência de mutação para a síndrome de Noonan é calculada normalmente para o estudo do gene *PTPN11* (sobre o total de pacientes estudados); para os demais genes a frequência de mutação é sempre calculada considerando apenas os indivíduos sem mutação no gene *PTPN11*. *Um paciente com SN apresentou mutação em mais de um gene da via RAS/MAPK – a mutação N308S no gene *PTPN11* e a mutação R552G no gene *SOS1;* **Esse paciente, previamente estudado, também apresentou a mutação p.L844R no gene *NF1* (Bertola *et al.*, 2005). Fonte: (Aoki *et al.*, 2005; Bertola *et al.*, 2005; Carta *et al.*, 2006; Cordeddu *et al.*, 2009; De Luca *et al.*, 2005; Digilio *et al.*, 2002; Martinelli *et al.*, 2010; Musante *et al.*, 2003; Nava *et al.*, 2007; Pandit *et al.*, 2007; Razzaque *et al.*, 2007; Rodriguez-Viciana *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2010; Sarkozy *et al.*, 2009; Seishima *et al.*, 2007; Tartaglia *et al.*, 2007; Zenker *et al.*, 2004; Zenker *et al.*, 2007a; Zenker *et al.*, 2007b)

## 4.4. Achados Clínicos

### 4.4.1. Síndrome de Noonan

A comparação dos achados clínicos entre os pacientes com SN, com e sem mutação, é apresentada para cada um dos genes estudados nas Tabelas 12 a 16.

**Tabela 12** – Achados clínicos dos propósitos com síndrome de Noonan, com e sem mutação no gene *PTPN11*

| | ***PTPN11 +*** | | ***PTPN11 -*** | | **Valor de p** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Quadro clínico** | n = 52 | | n = 100 | | |
| **Baixa estatura** | 44 | 85% | 59/99 | 60% | 0,0017* |
| **Face típica** | 35 | 67% | 66 | 66% | 1 |
| **pescoço curto e/ou alado** | 44/49 | 90% | 75/95 | 79% | 0,16 |
| **Deformidade esternal** | 30/50 | 60% | 41/92 | 45% | 0,11 |
| **Cardiopatia** | 41/51 | 80% | 66/95 | 69% | 0,17 |
| MIOCH com ou sem EPV | 5/41 | 12% | 12/66 | 18% | 0,59 |
| EPV com ou sem outra lesão | 32/41 | 78% | 30/66 | 45% | 0,0012* |
| **Criptorquidia** | 17/31 | 55% | 24/64 | 38% | 0,13 |
| **Atraso DNPM e/ou Déficit intelectual** | 19/34 | 56% | 39/55 | 71% | 0,17 |
| **Tumores** | | | | | |
| tumor de células gigantes | 2 | 4% | 3 | 3% | 1,00 |

Para face típica foi considerado o paciente que apresentou dois ou mais dismorfismos faciais oculares; MIOCH, miocardiopatia hipertrófica; EPV, estenose pulmonar valvar; DNPM, desenvolvimento neuro e psicomotor. * *p* significante < 0,05

**Tabela 13** – Achados clínicos dos pacientes com síndrome de Noonan com e sem mutação no gene *SOS1*

| | ***SOS1 +*** | | ***SOS1 -*** | | ***Valor de p*** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Quadro clínico** | n = 12 | | n = 140 | | |
| **Baixa estatura** | 6 | 50% | 97 | 69% | 0,20 |
| **Face típica** | 11 | 92% | 90 | 64% | 0,06 |
| **pescoço curto e/ou alado** | 11/11 | 100% | 108/133 | 81% | 0,21 |
| **Deformidade esternal** | 8/11 | 73% | 63/131 | 48% | 0,21 |
| **Cardiopatia** | 10/11 | 91% | 97/135 | 72% | 0,29 |
| MIOCH com ou sem EPV | 0/10 | 0% | 17/97 | 18% | 0,36 |
| EPV com ou sem outra lesão | 10/10 | 100% | 52/97 | 54% | 0,0047* |
| **Criptorquidia** | 4/8 | 50% | 37/87 | 43% | 0,72 |
| **Atraso DNPM e/ou Déficit intelectual** | 3/7 | 43% | 53/81 | 65% | 0,25 |
| **Tumores** | | | | | |
| tumor de células gigantes | 2 | 17% | 3 | 2% | 0,05 |

Para face típica foi considerado o paciente que apresentou dois ou mais dismorfismos faciais oculares; MIOCH, miocardiopatia hipertrófica; EPV, estenose pulmonar valvar; DNPM, desenvolvimento neuro e psicomotor. * *p* significante < 0,05

**Tabela 14** – Achados clínicos dos pacientes com síndrome de Noonan com e sem mutação no gene *RAF1*

| | ***RAF1 +*** | | ***RAF1 -*** | | ***Valor de p*** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Quadro clínico** | n = 7 | | n = 145 | | |
| **Baixa estatura** | 7 | 100% | 96/144 | 67% | 0,10 |
| **Face típica** | 7 | 100% | 94 | 65% | 0,10 |
| **pescoço curto e/ou alado** | 7 | 100% | 112/137 | 82% | 0,61 |
| **Deformidade esternal** | 3 | 43% | 68/135 | 50% | 1,00 |
| **Cardiopatia** | 7 | 100% | 100/139 | 72% | 0,19 |
| MIOCH com ou sem EPV | 6 | 86% | 11/100 | 11% | 0,0001* |
| EPV com ou sem outra lesão | 1 | 14% | 61/100 | 61% | 0,0400* |
| **Criptorquidia** | 2/4 | 50% | 39/91 | 43% | 1,00 |
| **Atraso DNPM e/ou Déficit intelectual** | 0 | 0% | 56/87 | 64% | 0,0012* |
| **Tumores** | | | | | |
| tumor de células gigantes | 0 | 0% | 5 | 3% | 1,00 |

Para face típica foi considerado o paciente que apresentou dois ou mais dismorfismos faciais oculares; MIOCH, miocardiopatia hipertrófica; EPV, estenose pulmonar valvar; DNPM, desenvolvimento neuro e psicomotor. * *p* significante < 0,05

**Tabela 15** – Achados clínicos dos pacientes com síndrome de Noonan com e sem mutação no gene *KRAS*

| | ***KRAS +*** | | ***KRAS -*** | | ***Valor de p*** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Quadro clínico** | n = 5 | | n = 147 | | |
| **Baixa estatura** | 2 | 40% | 101/146 | 69% | 0,33 |
| **Face típica** | 4 | 80% | 97 | 66% | 0,66 |
| **pescoço curto e/ou alado** | 4 | 80% | 115/139 | 83% | 1,00 |
| **Deformidade esternal** | 1 | 20% | 70/137 | 51% | 0,37 |
| **Cardiopatia** | 4 | 80% | 103/141 | 73% | 1,00 |
| MIOCH com ou sem EPV | 0 | 0% | 17/103 | 17% | 1,00 |
| EPV com ou sem outra lesão | 3/4 | 75% | 59/103 | 57% | 0,64 |
| **Criptorquidia** | 0/4 | 0% | 41/91 | 45% | 0,13 |
| **Atraso DNPM e/ou Déficit intelectual** | 2 | 40% | 54/86 | 63% | 0,37 |
| **Tumores** | | | | | |
| **tumor de células gigantes** | 0 | 0% | 5 | 3% | 1,00 |

Para face típica foi considerado o paciente que apresentou dois ou mais dismorfismos faciais oculares; MIOCH, miocardiopatia hipertrófica; EPV, estenose pulmonar valvar; DNPM, desenvolvimento neuro e psicomotor.

**Tabela 16** – Achados clínicos dos pacientes com síndrome de Noonan com e sem mutação no gene *BRAF*

| | ***BRAF +*** | | ***BRAF -*** | | ***Valor de p*** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Quadro clínico** | n = 3 | | n = 149 | | |
| **Baixa estatura** | 3 | 100% | 100/148 | 68% | 0,55 |
| **Face típica** | 1 | 33% | 100 | 67% | 0,26 |
| **pescoço curto e/ou alado** | 2 | 66% | 117/141 | 83% | 0,44 |
| **Deformidade esternal** | 0 | 0% | 71/140 | 51% | 0,25 |
| **Cardiopatia** | 2 | 66% | 105/143 | 73% | 1,00 |
| MIOCH com ou sem EPV | 1 | 33% | 16/105 | 15% | 0,41 |
| EPV com ou sem outra lesão | 0 | 0% | 62/105 | 59% | 0,07 |
| **Criptorquidia** | 1/1 | 100% | 40/94 | 43% | 0,43 |
| **Atraso DNPM e/ou Déficit intelectual** | 1/1 | 100% | 55/87 | 63% | 1,00 |
| **Tumores** | | | | | |
| **tumor de células gigantes** | 0 | 0% | 5 | 3% | 1,00 |

Para face típica foi considerado o paciente que apresentou dois ou mais dismorfismos faciais oculares; MIOCH, miocardiopatia hipertrófica; EPV, estenose pulmonar valvar; DNPM, desenvolvimento neuro e psicomotor. * *p* significante < 0,05

**Tabela 17** – Resumo comparativo das manifestações clínicas em pacientes com síndrome de Noonan e com mutação nos genes *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS* e *BRAF*

| | ***PTPN11 +*** | | ***SOS1 +*** | | ***RAF1 +*** | | ***KRAS +*** | | ***BRAF +*** | | **Valor de *p*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Quadro clínico** | n = 52 | | n = 12 | | n = 7 | | n = 5 | | n = 3 | | |
| **Baixa estatura** | 44 | 85% | 6 | 50% | 7 | 100% | 2 | 40% | 3 | 100% | 0,007* |
| **Face típica** | 35 | 67% | 11 | 92% | 7 | 100% | 4 | 80% | 1 | 33% | 0,086 |
| **pescoço curto e/ou alado** | 44/49 | 90% | 11/11 | 100% | 7 | 100% | 4 | 80% | 2 | 66% | 0,33 |
| **Deformidade esternal** | 30/50 | 60% | 8/11 | 73% | 3 | 43% | 1 | 20% | 0 | 0% | 0,08 |
| **Cardiopatia** | 41/51 | 80% | 10/11 | 91% | 7 | 100% | 4 | 80% | 2 | 66% | 0,60 |
| MIOCH com ou sem EPV | 5/41 | 12% | 0/10 | 0% | 6 | 86% | 0 | 0% | 1 | 33% | > 0,0001* |
| EPV com ou sem outra lesão | 32/41 | 78% | 10/10 | 100% | 1 | 14% | 3/4 | 75% | 0 | 0% | > 0,0001* |
| **Criptorquidia** | 17/31 | 55% | 4/8 | 50% | 2/4 | 50% | 0/4 | 0% | 1/1 | 100% | 0,26 |
| **Atraso DNPM e/ou Déficit intelectual** | 19/34 | 56% | 3/7 | 43% | 0 | 0% | 2 | 40% | 1/1 | 100% | 0,07 |
| **Tumores** | | | | | | | | | | | |
| tumor de células gigantes | 2 | 4% | 2 | 17% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0,36 |

Para face típica foi considerado o paciente que apresentou dois ou mais dismorfismos faciais oculares; MIOCH, miocardiopatia hipertrófica; EPV, estenose pulmonar valvar; DNPM, desenvolvimento neuro e psicomotor. * *p* significante < 0,05

Mutação no gene *SHOC2* foi identificada em dois pacientes com SN, apresentando o seguinte quadro clínico: cabelos finos de crescimento lento, face sugestiva, baixa estatura, pescoço curto e/ou alado, cardiopatia (um com EPV e o outro com comunicação inter-atrial) e um deles com déficit intelectual. Estes pacientes, primeiramente classificados como

portadores da SN, com a identificação da mutação no gene *SHOC2,* foram reclassificados como afetados pela SNL-PCA.

### 4.4.2. Síndromes de Noonan-like

No estudo molecular nas SNL, quatro pacientes com SL apresentaram mutação no gene *PTPN11*. Os achados clínicos deste pacientes incluem: face típica (2/4), baixa estatura (2/4), pescoço curto e/ou alado (3/4), deformidade esteral (1/4), cardiopatia (4/4 MIOCH), manchas lentiginosas (4/4) e déficit intelectual (1/4).

Mutação no gene *SOS1* foi identificada em apenas um paciente com diagnóstico clínico da SC, o qual apresentava os seguintes achados: face típica, baixa estatura, pescoço curto e/ou alado, *pectus excavatum*, cardiopatia (anomalia de Ebstein), déficit intelectual, pregas palmares e plantares evidentes, queratose folicular e hiperpigmentação. Como há um consenso de que o epônimo síndrome de Costello seja empregado apenas para pacientes com mutação no gene *HRAS*, esse paciente foi reclassificado como afetado pela SN (Gripp *et al.*, 2011).

Mutações no gene *KRAS* foram identificadas em 2 pacientes: um com SC e face típica, baixa estatura, pescoço curto e/ou alado, *pectus excavatum*, cardiopatia (MIOCH e EPV), nervos corneanos proeminentes e embriotoxon posterior, pregas palmares e plantares evidentes, papiloma nasal, hiperpigmentação e linfedema; e o outro com CFC, apresentando face típica, baixa estatura, pescoço curto e/ou alado, cardiopatia (valva pulmonar espessada e insuficiência mitral), estabismo, escoliose, mancha CAL no dorso e pregas palmares e plantares evidentes.

Mutações no gene *BRAF* foram identificadas em 8 pacientes com CFC, com o seguinte quadro clínico: face típica (6/8), baixa estatura (4/8), pescoço curto e/ou alado (8/8), *pectus excavatum* (2/8), cardiopatia (4/8 – 1 MIOCH, 2 EPV e 1 estenose supravalvar pulmonar), déficit intelectual (6/8), escoliose (2/8), hiperqueratose folicular e/ou palmo-plantar (7/8).

Mutações no gene *SHOC2* foram identificadas em 2 pacientes com CFC, com os seguintes achados clínicos: cabelos finos de crescimento lento, face típica, baixa estatura,

pescoço curto e/ou alado, déficit intelectual, cifose, cardiopatia (um com EPV e o outro com insuficiência mitral e tricúspide), um deles com *pectus carinatum/excavatum* e o menino com criptorquidia. Estes pacientes, primeiramente classificados como portadores da CFC, após a identificação da mutação no gene *SHOC2*, foram reclassificados como afetados pela SNL-PCA.

Foi encontrada apenas uma mutação no gene *HRAS* em um paciente com SC, com o quadro clínico típico para esta síndrome: baixa estatura, face típica, pescoço curto e/ou alado, sem cardiopatia, cabelos esparssos e encaracolados, lábios grossos evertidos, língua protusa, pregas palmares e plantares evidentes, polidramnio, dificuldade importante para se alimentar, gastrostomia com 9m, cirurgia de refluxo gastro-esofágico com 15m, febre de origem indeterminada.

### 4.4.3. Achados Raros

#### 4.4.3.1. Craniossinostose

Um caso familial de SN apresentava a mutação p.M72L no gene *KRAS*, que também foi identificada na mãe e na irmã do probando, ambas também afetadas pela SN. Este paciente desenvolveu uma craniossinostose da sutura frontal.

#### 4.4.3.2. Tumores

Na nossa casuística cinco pacientes com SN apresentaram lesões múltiplas com células gigantes (SN-LMCG), quatro deles com mutação identificada – p.N308S e p.Q510P no gene *PTPN11,* p.M269R e p.R552T no gene *SOS1*. Em dois casos a lesão foi identificada no osso da maxila, em um caso no osso da mandíbula e em dois casos a lesão atingiu ambos os ossos.

Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) foi observada em dois pacientes com SN e mutação no gene *PTPN11*, um deles com a mutação p.T73I e o outro com a p.E69V. Nos dois casos a leucemia teve início nos primeiros meses de vida e regrediu espontaneamente.

Um paciente com SN com a mutação p.P261S no gene *RAF1*, sabidamente patogênica, desenvolveu um tumor cístico expansivo em fossa posterior. Infelizmente não foi possível recuperar os dados para melhor caracterização desta tumoração.

Um paciente com características clínicas sugestivas da SC e com a mutação p.K5E no gene *KRAS* desenvolveu uma schwanomatose difusa. Esta é considerada como um tumor benigno, porém raramente pode malignizar.

# 5. DISCUSSÃO

# 5. DISCUSSÃO

## 5.1. Estudo molecular

### 5.1.1. Síndrome de Noonan

O estudo dos diferentes genes responsáveis pela SN mostrou, assim como na literatura, um maior envolvimento do gene *PTPN11* seguido dos genes *SOS1* e *RAF1*. Embora na literatura aproximadamente 61% dos indivíduos com SN apresentem a confirmação do diagnóstico pelo teste molecular (Romano *et al.*, 2010), na nossa casuística, alterações gênicas foram identificadas em 53% (80/152) dos casos avaliados, com menor porcentagem de mutações observadas nos genes *SOS1* e *RAF1*. Possíveis justificativas para essa discrepância incluem: os critérios diagnósticos utilizados para a inclusão dos pacientes, como observado por Tartaglia *et al.* (2011); o não rastreamento de todos os éxons codificantes do gene *RAF1;* e o fato de o local de estudo ser um Hospital Terciário que, em geral, recebe encaminhamento de pacientes com um quadro clínico mais grave e, portanto, com uma menor possibilidade de avaliar pacientes com mutações no gene *SOS1* – os quais tendem a apresentar uma menor incidência de baixa estatura e déficit intelectual, causas comuns de encaminhamento.

O estudo conjunto de sete genes em 194 pacientes com SN ou SNL foi realizado na tentativa de avaliar se a grande variabilidade fenotípica encontrada nas síndromes poderia ser explicada pela presença de mutações em mais de um gene da via RAS/MAPK. No total, apenas um paciente com quadro clínico típico da SN apresentou duas mutações reconhecidamente patogênicas (p.N308S no gene *PTPN11* e p.R552G no gene *SOS1*), indicando que está possibilidade não é frequente, além de não agravar o fenótipo e não

explicar a variabilidade clínica nesta síndrome. Alguns casos como este foram descritos na literatura, sempre com a identificação de uma das mutações em um dos genitores. Um caso envolvia alterações nos genes *PTPN11* e *SHOC2* e o outro, nos genes *SOS1* e *RAF1* (Ekvall *et al.*, 2011; Longoni *et al.*, 2010), onde a mutação presente nos genitores coincidiu com um quadro clínico mais leve, sugerindo que esta exerça um efeito aditivo e que atue como um modificador do fenótipo. Já a mutação presente apenas no caso índice típico, foi considerada responsável pela manifestação clínica da SN. De forma semelhante, em dois pacientes com neurofibromatose-síndrome de Noonan (NFSN) também se observou a presença de mutações em diferentes genes da via RAS/MAPK (neste caso envolvendo os genes *NF1* e *PTPN11*), sempre uma delas herdada de um dos genitores (Bertola *et al.*, 2005; Thiel *et al.*, 2009). No nosso caso, também há uma grande chance de uma das duas mutações ser herdada, enquanto a outra seja um evento *de novo* – uma vez que a taxa de ocorrência de uma nova mutação é bastante rara, da ordem de $10^{-4}$ a $10^{-6}$ (Regateiro, 2003). Infelizmente, no presente caso só foi possível avaliar a mãe, a qual não apresentava a alteração gênica. A recusa do pai em ser avaliado, tanto clinica como molecularmente, não permitiu confirmar essa hipótese.

### 5.1.2. Síndromes Noonan-like

Dentre as SNL estudadas, os quatro probandos com síndrome de LEOPARD, um deles um caso familial, apresentavam a mesma mutação no gene *PTPN11* (p.Y279C), considerada a mais comum. Esta síndrome é considerada alélica à SN, uma vez que as duas doenças decorrem de mutações no mesmo gene, embora as mutações sejam distintas (Digilio *et al.*, 2002; Sarkozy *et al.*, 2004).

Na síndrome CFC, o gene principal é o *BRAF* (78%), mas mutações nos genes *MEK1* e *MEK2* podem estar presentes em 13% dos casos (Rodriguez-Viciana *et al.*, 2006). Neste estudo, foi avaliado apenas o gene *BRAF*, no qual mutações foram identificadas em uma frequência menor (42%). É possível que nesta população os genes *MEK1* e *MEK2* exerçam um efeito maior.

Mutação no gene *HRAS*, considerado o único gene associado à SC (Gripp *et al.*, 2011), foi encontrada em um único paciente: p.G12S. Esta mutação é a mais comum na síndrome, com um risco de desnvolvimento de neoplasia em torno de 7% (Kerr *et al.*, 2006). Como a SC, dentre todas as RASopatias, é a que apresenta maior risco para o desenvolvimento de neoplasias, essa paciente necessita de seguimento e realização de exames preventivos conforme propostos por Gripp *et al.* (2002).

Este estudo não contempla a análise do gene *NF1*, responsável pela quase totalidade dos casos de NFSN (De Luca *et al.*, 2005). O único paciente deste trabalho que apresentava mutação tanto no gene *NF1* como no gene *PTPN11* já havia sido previamente estudado (Bertola *et al.*, 2006).

### 5.1.3. Alterações não descritas encontradas

Algumas alterações gênicas encontradas neste estudo não foram descritas previamente: quatro no gene *BRAF*, duas no gene *KRAS*, uma no gene *SHOC2* e outra no gene *SOS1*. Destas, não foi possível estabelecer com precisão a patogenicidade para duas delas (p.R626K no gene *BRAF* e p.620_621insH no gene *SOS1*), as quais aguardam futuros estudos. A classificação destas alterações em patogênicas ou não patogênicas (polimorfismo ou uma variante rara) não é uma tarefa fácil. Vários parâmetros são levados em consideração para atestar a sua patogenicidade. As ferramentas de bioinformática são frequentemente utilizadas para a predição *in silico* por terem fácil acesso. Métodos mais complexos, como os testes funcionais celulares e em modelos animais, requerem estrutura e conhecimento especializados.

## 5.2. Achados clínicos

### 5.2.1. Síndrome de Noonan

Na casuística dos pacientes com SN e mutações identificadas observou-se uma alta frequência das seguintes características clínicas, compatíveis com os dados da literatura (Romano *et al.*, 2010): pescoço curto e/ou alado (91%), presença de cardiopatia (83%), baixa estatura (80%), face típica (71%), deformidade esternal (54%) e criptorquidia (50%). Quanto ao tipo de cardiopatia, a EPV foi a mais comum (71%), seguida de MIOCH (18%).

As características faciais na SN variam conforme a idade, em geral, sendo mais sutis nos adultos (Allanson, 1987). Por outro lado, Romano *et al.* afirmaram que alguns indivíduos adultos permanecem com as caracterísitcas faciais típicas (2010). Neste estudo, identificamos mutação no gene *PTPN11* em oito casos familiais afetadas pela SN. A avaliação dos principais achados clínicos, incluindo as características faciais, entre os probandos e os familiares afetados não mostrou diferença significante, de acordo com a descrição de Romano *et al.* (2010).

Em todos os casos familiais confirmados, a avaliação clínica dos genitores evidenciou características clínicas suficientes para a suspeita diagnóstica. Em nenhum caso aparentemente isolado, a mutação foi identificada em um dos genitores, confirmando que a SN apresenta penetrância completa (Tartaglia *et al.*, 2002b). Este dado é essencial para estimar de forma precisa o risco de recorrência para futuros filhos do casal em questão. A presença de mosaicismo gonadal recentemente descrita na SN (Elalaoui *et al.*, 2010),embora seja considerado um evento raro, alerta para uma reavaliação, com provável aumento do risco de recorrência estimado.

### 5.2.2. Síndromes de Noonan-like

Os pacientes com SNL, bem mais raras que a SN, avaliados neste trabalho e com mutação identificada, possuíam as características típicas de cada uma delas: os probandos com síndrome de LEOPARD apresentavam manchas lentiginosas e MIOCH; os pacientes com NFSN, um quadro típico de NF1 e alguns sinais sugestivos da SN; o lactente com SC apresentava história de polidrâmnio, dificuldade importante para se alimentar, necessitando de gastrostomia, face típica e hiperelasticidade cutânea, com pregas palmares e plantares evidentes. Os oito pacientes com a síndrome CFC, todos do sexo feminino, apresentavam atraso do desenvolvimento neuropsicomotor/déficit intelectual e envolvimento ectodérmico evidente. Em quatro destes pacientes, o exame de imagem do sistema nervoso central evidenciou dilatação ventricular, achado frequente na síndrome (Papadopoulou *et al.*, 2011).

## 5.3. Correlação genótipo-fenótipo

A comparação dos achados clínicos, levando em consideração as alterações gênicas, confirma algumas correlações já descritas na literatura (Tartaglia *et al.*, 2010; Zenker, 2011). Na nossa casuística, observamos que pacientes com SN e mutação no gene: *PTPN11* apresentaram maior frequência de EPV e baixa estatura; *SOS1,* apresentaram maior frequência de EPV; *RAF1,* apresentaram maior frequência de MIOCH e, menor frequência de EPV e déficit intelectual; *SHOC2,* apresentaram anormalidades de cabelo (cabelo fino e com crescimento lento, e perda de cabelos anágenos). Embora algumas relações tenham sido estabelecidas, não há uma correlação precisa entre um genótipo e uma característica típica específica.

## 5.4. Achados Raros

### 5.4.1. Craniossinostose

Esta anormalidade do fechamento das suturas cranianas já foi descrita em três pacientes com SN e mutação no gene *KRAS*, com o envolvimento das suturas: sagital, coronal e lambdoidea (Kratz *et al.*, 2009; Schubbert *et al.*, 2006). Na nossa casuística, um probando com SN familial e a mutação p.M72L no gene *KRAS*, desenvolveu o fechamento da sutura frontal nos primerios meses de vida. Esta descrição amplia o rol de suturas acometidas na craniossinostose observadas em pacientes com SN e mutações no gene *KRAS*. O fato da via de sinalização RAS/MAPK estar diretamente relacionada aos genes *FGFRs* (*fibroblast growht fator receptors*) – principais genes envolvidos no desenvolvimento das formas mendelianas da craniossinostose sindrômica (Wilkie *et al.*, 2006) – sugere que o gene *KRAS* também possa exercer um papel no fechamento das suturas cranianas. Além disso, a papel da via RAS/MAPK na gênese da craniossinostose foi demonstrado em um modelo animal com a síndrome de Apert (causada por mutação no gene *FGFR2*), na qual a inibição desta via preveniu o desenvolvimento da craniossinostose (Passos-Bueno *et al.*, 2008; Shukla *et al.*, 2007).

### 5.4.2. Tumores

Devido ao fato de pacientes afetados pela SN terem um bom prognóstico, com sobrevida normal na maioria dos casos, os estudos recentes têm objetivado averiguar o risco do desenvolvimento de tumores nesta síndrome, uma vez que alguns dos genes envolvidos são proto-oncogenes. O reconhecimento molecular e avaliações periódicas dos pacientes são essenciais para averiguar este risco.

Na nossa casuística cinco pacientes com SN apresentavam lesões múltiplas de células gigantes (SN-LMCG) envolvendo os genes *PTPN1* e *SOS1*, ambos os genes já descritos em

associação com a SN e este tumor (Hanna *et al.*, 2009; Tartaglia *et al.*, 2002b). A presença destas lesões não é um achado exclusivo da SN, uma vez que já foi descrita em pacientes com SNL (Neumann *et al.*, 2009). Em pacientes com CFC também há descrição de LMGC com o envolvimento dos genes *BRAF* e *MEK1* (Tartaglia *et al.*, 2011). O granuloma de células gigantes é considerado um tumor benigno, no qual o tratamento de escolha é a ressecção da lesão. Entretanto, alguns pacientes podem apresentar recorrência ou mesmo o tumor pode apresentar um caráter mais agressivo, dificultando o tratamento. Caso o indivíduo também apresente distúrbio de coagulação, que ocorre em 1/3 dos afetados pela SN, há um risco aumentado na realização do procedimento cirúrgico (Wolvius *et al.*, 2006).

A leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) foi observada em dois pacientes com SN e mutações no gene *PTPN11*: um deles com a mutação p.T73I e o outro com a p.E69V. Nos dois casos a leucemia teve início nos primeiros meses de vida e regrediu espontaneamente. Em geral, este é o curso observado em pacientes com SN e esta síndrome mielodisplásica, porém na maioria dos casos algumas alterações hematológicas podem persistir, como a esplenomegalia e a monocitose. Embora diferentes mutações no gene *PTPN11* sejam descritas na LMMJ, a mutção p.T73I é a mais comum (Bastida *et al.*, 2011), a mesma encontrada em um dos nossos pacientes. Recentemente, pacientes com SN e mutações no gene *CBL* também apresentam predisposição para esta leucemia (Zenker, 2011).

Um paciente com SN e a mutação p.P261S no gene *RAF1*, desenvolveu um tumor cístico expansivo em fossa posterior. Anormalidades em fossa posterior com aumento progressivo de suas estruturas e herniação da tonsila cerebelar foram descritas em pacientes com síndrome de Costello. Como consequência, esses pacientes evoluem com hidrocefalia, má formação de Chiari tipo 1 e seringomielia (Gripp *et al.*, 2010).

Um paciente com características clínicas sugestivas da SC e com a mutação p.K5E no gene *KRAS* desenvolveu uma schwanomatose difusa. Esta é considerada um tumor benigno, porém raramente pode malignizar. Este é o primeiro caso descrito de tumor sólido em paciente com SC e mutação no gene *KRAS* (Bertola *et al.*, 2011). A presença deste tumor foi descrita em dois pacientes (com SN e SC), previamente a identificação dos genes responsáveis por estas doenças (Kaplan *et al.*, 1968; Suri *et al.*, 1998). O crescimento

exacerbado da bainha dos nervos periféricos (neurofibromas) também é observado em pacientes com NF1, causada por mutações no gene supressor tumoral *NF1*, também pertencente a via RAS/MAPK. A ativação desta via regula mTOR (*mammalian target of rapamycin*), o qual é dependente da via PI3K, que é crítica na patogênese da doença. Embora estudos funcionais não estejam disponíveis para a mutação p.K5E encontrada neste estudo, outra alteração gênica afetando o mesmo resíduo (p.K5N) demonstrou um impacto na função da via RAS/MAPK (Johannessen *et al.*, 2005). De forma similar, a mutação p.K5E encontrada no gene *KRAS* nesta casuística pode ter causado o desenvolvimento de schwanomas difusos decorrente da ativação da via mTOR.

Dentre as alterações não descritas identificadas neste estudo, as descritas abaixo já foram relacionadas, elas mesmas ou o seu resíduo, como um evento somático em neoplasia (Forbes *et al.*, 2011):

- p.M72L no gene *KRAS*: mutação envolvendo o mesmo resíduo, p.M72I, já foi descrita como evento somático mieloma múltiplo;

- p.464E no gene *BRAF*: já foi descrita como mutação somática em carcinoma cortical na glândula adrenal, carcinoma e adenocarcinoma no intestino grosso, carcinoma ovariano e no trato superior aero-digestivo;

- p.K601I no gene *BRAF*: já foi descrita como mutação somática em melanoma na pele, carcinoma e adenoma na tireóide, e carcinoma, adenocarcinoma e adenoma no intestino grosso.

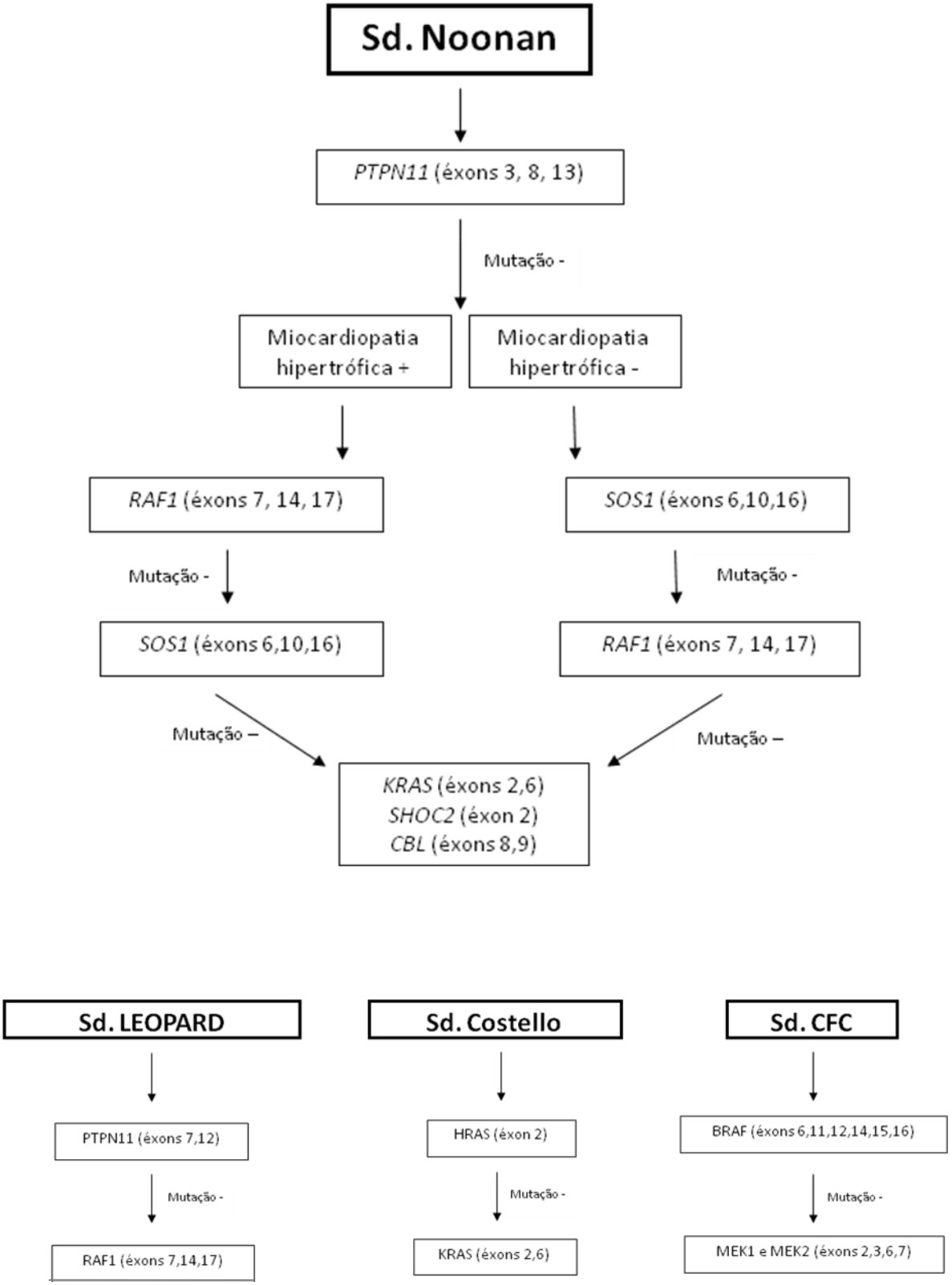
O risco de desenvimento de neoplasias nas RASopatias é melhor estabelecido para a SC, em torno de 17% (Gripp, 2005). Nesta síndrome, as mutações germinativas encontradas no gene *HRAS* se sobrepõem àquelas indetificadas nos tumores como eventos somáticos. As mutações não descritas aqui discutidas envolvem os genes *KRAS* e *BRAF*, também associados a neoplasias. Por hora, não é possível estabelecer com precisão se essas mutações conferem um aumento no risco de neoplasias nesses pacientes. Como há uma variedade grande de

tipos de tumores, o que impossibilita uma triagem preventiva, o seguimento clínico desses pacientes é essencial para um diagnóstico mais precoce e um manejo mais adequado.

### 5.5. Estratégia de Investigação Molecular

A partir deste estudo e de estudos anteriores (Romano *et al.*, 2010; Tartaglia *et al.*, 2010; Zenker, 2011) foi possível estabelecer quais são os éxons mais frequentemente envolvidos na SN e SNL em nosso meio, o que facilita a abordagem do estudo molecular. Além disso, embora a correlação genótipo-fenótipo não seja totalmente precisa, uma maior incidência de algumas características clínicas, em especial o tipo de cardiopatia (Tabela 14), auxilia na criação de um fluxograma para a investigação molecular. Sugere-se, portanto, o seguinte fluxograma para investigação molecular (Figura 2):

**Figura 2** – Fluxograma para estratégia de investigação molecular nas síndromes de Noonan e Noonan-like



Na síndrome NFSN, a quase totalidade dos casos é decorrente de mutações no gene *NF1*. Apenas dois casos foram descritos na literatura, nos quais o probando apresentava mutação em outro gene na via RAS/MAPK além do gene *NF1* (Bertola *et al.*, 2005; Thiel *et al.*, 2009). Portanto, a estratégia de investigação molecular nesta síndrome envolve o estudo do gene *NF1*.

Embora um grande avanço no conhecimento sobre SN e SNL tenha sido alcançado, vários aspectos precisam ser melhor elucidados, como: caracterização precisa da propensão ao desenvolvimento de neoplasias, estudos que permitam avaliar as consequências biológicas das mutações, identificação de outros genes responsáveis, assim como outros fatores genéticos e/ou ambientais que possam explicar a variabilidade clínica inter e intrafamilial.

# 6. CONCLUSÃO

# 6. CONCLUSÃO

O estudo molecular das SN e SNL ainda não responde pela totalidade dos casos. Na casuística de 194 indivíduos deste trabalho, mutações nos diferentes genes da via RAS/MAPK foram encontradas em 99 pacientes. Ou seja, 95 pacientes clinicamente afetados pelas SN e SNL permanecem sem diagnóstico molecular, sugerindo o envolvimento de um ou mais genes ainda não descritos para essas síndromes.

A correlação genótipo-fenótipo explica parte da grande variabilidade clínica observada na SN. Alguns achados clínicos estão estabelecidos e, apesar de não serem típicos e exclusivos para uma das SN ou SNL, auxiliam na estratégia de investigação molecular, que por sua vez otimiza a confirmação do diagnóstico clínico na atualidade.

Mutações reconhecidamente patogênicas em mais de um gene da via RAS/MAPK é um eventeo raro, não agrava o fenótipo e não explica a variabilidade clínica nesta síndrome. É possível que alterações em outros genes, polimorfismos, variação no número de cópias de DNA ou até a epigenética possam justificar tal variabilidade.

A dificuldade no diagnóstico clínico das SN e SNL continua sendo um desafio, uma vez que estas síndromes apresentam variabilidade fenotípica tanto intra como inter síndromes, além da ausência de um critério típico e exclusivo de cada uma. Com isso, o diagnóstico molecular torna-se uma ferramenta cada vez mais útil para a confirmação diagnóstica, para o prognóstico, especialmente em relação ao desenvolvimento de neoplasias, e para o estabelecimento mais preciso do risco de recorrência da doença na família em questão.

# 7. REFERÊNCIAS

## 7. REFERÊNCIAS

Allanson JE. *Noonan syndrome*. J Med Genet. 1987;24(1):9-13.

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;29(8):992-1006.

Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y*, et al. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome*. Nat Genet. 2005;37(10):1038-40.

Bastida P, Garcia-Minaur S, Ezquieta B, Dapena JL, Sanchez de Toledo J. *Myeloproliferative disorder in Noonan syndrome*. J Pediatr Hematol Oncol. 2011;33(1):e43-5.

Beneteau C, Cave H, Moncla A, Dorison N, Munnich A, Verloes A*, et al. SOS1 and PTPN11 mutations in five cases of Noonan syndrome with multiple giant cell lesions*. Eur J Hum Genet. 2009;17(10):1216-21.

Bertola D, Pereira A, Brasil A, Suzuki L, Leite C, Falzoni R*, et al. Multiple, diffuse schwannomas in a RASopathy phenotype patient with germline KRAS mutation: a causal relationship?* Clinical Genetics. 2011;In press.

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 A. 2004;130(4):378-83.

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(3):186-91.

Bertola DR, Pereira AC, Brasil AS, Albano LM, Kim CA, Krieger JE. *Further evidence of genetic heterogeneity in Costello syndrome: involvement of the KRAS gene*. J Hum Genet. 2007;52(6):521-6.

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.

Bonioli E, Cordone G, Dellacasa C, Iester A, Vianello MG, Gemme G. *[Partial trisomy of the long arm of chromosome 4: a new syndrome]*. Minerva Pediatr. 1980;32(21):1241-8.

Bos JL. *ras oncogenes in human cancer: a review*. Cancer Res. 1989;49(17):4682-9.

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.

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.

Chen Y, Takita J, Hiwatari M, Igarashi T, Hanada R, Kikuchi A*, et al. Mutations of the PTPN11 and RAS genes in rhabdomyosarcoma and pediatric hematological malignancies*. Genes Chromosomes Cancer. 2006;45(6):583-91.

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;42(1):27-9.

Cohen Jr M, Ruvalcaba R, Graham C, Harrison M, Morgan A. *A new syndrome simulating the Noonan syndrome, the Leopard syndrome, and hyperparathyroidism.* Synd Identif. 1974;2(14-7.

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;41(9):1022-6.

Costello JM. *A new syndrome: mental subnormality and nasal papillomata*. Aust Paediatr J. 1977;13(2):114-8.

Costello JM. *Costello syndrome: update on the original cases and commentary*. Am J Med Genet. 1996;62(2):199-201.

De Luca A, Bottillo I, Sarkozy A, Carta C, Neri C, Bellacchio E*, et al. NF1 gene mutations represent the major molecular event underlying neurofibromatosis-Noonan syndrome*. Am J Hum Genet. 2005;77(6):1092-101.

de Majo SF, de Otero BC, Reichmann A. *[Noonan syndrome: differential diagnosis with Turner's syndrome]*. Bol Med Hosp Infant Mex. 1979;36(6):1089-97.

Digilio MC, Marino B. *Clinical manifestations of Noonan syndrome*. Images Paediatr Cardiol. 2001;7(19-30.

Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, Marino B*, et al. Grouping of multiple-lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene*. Am J Hum Genet. 2002;71(2):389-94.

Doco-Fenzy M, Mauran P, Lebrun JM, Bock S, Bednarek N, Struski S*, et al. Pure direct duplication (12)(q24.1-->q24.2) in a child with Marcus Gunn phenomenon and multiple congenital anomalies*. Am J Med Genet A. 2006;140(3):212-21.

Ekvall S, Hagenas L, Allanson J, Anneren G, Bondeson ML. *Co-occurring SHOC2 and PTPN11 mutations in a patient with severe/complex Noonan syndrome-like phenotype*. Am J Med Genet A. 2011;155A(6):1217-24.

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

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;90(9):5156-60.

Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D*, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*. Nucleic Acids Res. 2011;39(Database issue):D945-50.

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.

Gripp KW. *Tumor predisposition in Costello syndrome*. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2005;137C(1):72-7.

Gripp KW, Lin AE. *Costello syndrome: A Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations*. Genet Med. 2011.

Gripp KW, Hopkins E, Doyle D, Dobyns WB. *High incidence of progressive postnatal cerebellar enlargement in Costello syndrome: brain overgrowth associated with HRAS mutations as the likely cause of structural brain and spinal cord abnormalities*. Am J Med Genet A. 2010;152A(5):1161-8.

Gripp KW, Scott CI, Jr., Nicholson L, McDonald-McGinn DM, Ozeran JD, Jones MC*, et al. Five additional Costello syndrome patients with rhabdomyosarcoma: proposal for a tumor screening protocol*. Am J Med Genet. 2002;108(1):80-7.

Hanna N, Parfait B, Talaat IM, Vidaud M, Elsedfy HH. *SOS1: a new player in the Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome*. Clin Genet. 2009;75(6):568-71.

Jett K, Friedman JM. *Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1*. Genet Med. 2010;12(1):1-11.

Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K. *The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(24):8573-8.

John M. Graham J, Kramer N, Bejjani BA, Thiel CT, Carta C, Neri G*, et al. Genomic Duplication of PTPN11 is an Uncommon Cause of Noonan Syndrome*. Am J Med Genet A. 2009;Am J Med Genet A(10):2122–28.

Jongmans MC, van der Burgt I, Hoogerbrugge PM, Noordam K, Yntema HG, Nillesen WM*, et al. Cancer risk in patients with Noonan syndrome carrying a PTPN11 mutation*. Eur J Hum Genet. 2011;19(8):870-4.

Jongmans MC, Hoogerbrugge PM, Hilkens L, Flucke U, van der Burgt I, Noordam K*, et al. Noonan syndrome, the SOS1 gene and embryonal rhabdomyosarcoma*. Genes Chromosomes Cancer. 2010;49(7):635-41.

Kaplan MS, Opitz JM, Gosset FR. *Noonan's syndrome. A case with elevated serum alkaline phosphatase levels and malignant schwannoma of the left forearm*. Am J Dis Child. 1968;116(4):359-66.

Keren B, Hadchouel A, Saba S, Sznajer Y, Bonneau D, Leheup B*, et al. PTPN11 mutations in patients with LEOPARD syndrome: a French multicentric experience*. J Med Genet. 2004;41(11):e117.

Kerr B, Delrue MA, Sigaudy S, Perveen R, Marche M, Burgelin I*, et al. Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases*. J Med Genet. 2006;43(5):401-5.

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;31(3):284-94.

Kratz CP, Zampino G, Kriek M, Kant SG, Leoni C, Pantaleoni F*, et al. Craniosynostosis in patients with Noonan syndrome caused by germline KRAS mutations*. Am J Med Genet A. 2009;149A(5):1036-40.

Kratz CP, Niemeyer CM, Castleberry RP, Cetin M, Bergstrasser E, Emanuel PD*, et al. The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/myeloproliferative disease*. Blood. 2005;106(6):2183-5.

Kumar P, Henikoff S, Ng PC. *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. Nat Protoc. 2009;4(7):1073-81.

Loh ML, Vattikuti S, Schubbert S, Reynolds MG, Carlson E, Lieuw KH*, et al. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis*. Blood. 2004;103(6):2325-31.

Longoni M, Moncini S, Cisternino M, Morella IM, Ferraiuolo S, Russo S*, et al. Noonan syndrome associated with both a new Jnk-activating familial SOS1 and a de novo RAF1 mutations*. Am J Med Genet A. 2010;152A(9):2176-84.

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.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res. 1988;16(3):1215.

Money J, Kalus ME, Jr. *Noonan's syndrome. IQ and specific disabilities*. Am J Dis Child. 1979;133(8):846-50.

Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillessen-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.

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.

Neumann TE, Allanson J, Kavamura I, Kerr B, Neri G, Noonan J*, et al. Multiple giant cell lesions in patients with Noonan syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome*. Eur J Hum Genet. 2009;17(4):420-5.

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;38(3):294-6.

Noonan JA. *Noonan syndrome. An update and review for the primary pediatrician*. Clin Pediatr (Phila). 1994;33(9):548-55.

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.

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;39(8):1007-12.

Papadopoulou E, Sifakis S, Sol-Church K, Klein-Zighelboim E, Stabley DL, Raissaki M*, et al. CNS imaging is a key diagnostic tool in the evaluation of patients with CFC syndrome: two cases and literature review*. Am J Med Genet A. 2011;155A(3):605-11.

Passos-Bueno MR, Serti Eacute AE, Jehee FS, Fanganiello R, Yeh E. *Genetics of craniosynostosis: genes, syndromes, mutations and genotype-phenotype correlations*. Front Oral Biol. 2008;12(107-43.

Pierpont EI, Pierpont ME, Mendelsohn NJ, Roberts AE, Tworog-Dube E, Rauen KA*, et al. Effects of germline mutations in the Ras/MAPK signaling pathway on adaptive behavior: cardiofaciocutaneous syndrome and Noonan syndrome*. Am J Med Genet A. 2010;152A(3):591-600.

Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. *Human non-synonymous SNPs: server and survey*. Nucleic Acids Res. 2002;30(17):3894-900.

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.

Regateiro FJ. Mutações do DNA. In Manual de Genética Médica, IdUd Coimbra, ed., pp. 46-48; 2003.

Reynolds JF, Neri G, Herrmann JP, Blumberg B, Coldwell JG, Miles PV*, et al. New multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome with cardio-facio-cutaneous involvement--the CFC syndrome*. Am J Med Genet. 1986;25(3):413-27.

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.

Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS*, et al. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome*. Science. 2006;311(5765):1287-90.

Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME*, et al. Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines*. Pediatrics. 2010;126(4):746-59.

Rozen S, Skaletsky H. *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol. 2000;132(365-86.

Sarkozy A, Conti E, Digilio MC, Marino B, Morini E, Pacileo G*, et al. Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentigines LEOPARD syndrome*. J Med Genet. 2004;41(5):e68.

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.

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.

Schubbert S, Shannon K, Bollag G. *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. Nat Rev Cancer. 2007;7(4):295-308.

Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G*, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome*. Nat Genet. 2006;38(3):331-6.

Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. *MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations*. Nat Methods. 2010;7(8):575-6.

Seishima M, Mizutani Y, Shibuya Y, Arakawa C, Yoshida R, Ogata T. *Malignant melanoma in a woman with LEOPARD syndrome: identification of a germline PTPN11 mutation and a somatic BRAF mutation*. Br J Dermatol. 2007;157(6):1297-9.

Shchelochkov OA, Patel A, Weissenberger GM, Chinault AC, Wiszniewska J, Fernandes PH*, et al. Duplication of chromosome band 12q24.11q24.23 results in apparent Noonan syndrome*. Am J Med Genet A. 2008;146A(8):1042-8.

Shukla V, Coumoul X, Wang RH, Kim HS, Deng CX. *RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis*. Nat Genet. 2007;39(9):1145-50.

Siwik ES, Zahka KG, Wiesner GL, Limwongse C. *Cardiac disease in Costello syndrome*. Pediatrics. 1998;101(4 Pt 1):706-9.

Suri M, Garrett C. *Costello syndrome with acoustic neuroma and cataract. Is the Costello locus linked to neurofibromatosis type 2 on 22q?* Clin Dysmorphol. 1998;7(2):149-51.

Tartaglia M, Zampino G, Gelb BD. *Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis*. Mol Syndromol. 2010;1(1):2-26.

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

Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A*, et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia*. Nat Genet. 2003;34(2):148-50.

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.

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. 2002a;70(6):1555-63.

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. 2002b;70(6):1555-63.

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.

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.

Tidyman WE, Rauen KA. *The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation*. Curr Opin Genet Dev. 2009.

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.

Voron DA, Hatfield HH, Kalkhoff RK. *Multiple lentigines syndrome. Case report and review of the literature*. Am J Med. 1976;60(3):447-56.

Wilkie AO, Bochukova EG, Hansen RM, Taylor IB, Rannan-Eliya SV, Byren JC*, et al. Clinical dividends from the molecular genetic diagnosis of craniosynostosis*. Am J Med Genet A. 2006;140(23):2631-9.

Wolvius EB, de Lange J, Smeets EE, van der Wal KG, van den Akker HP. *Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome: report of a case and review of the literature*. J Oral Maxillofac Surg. 2006;64(8):1289-92.

Zenker M. *Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors*. Curr Opin Pediatr. 2011;23(4):443-51.

Zenker M, Buheitel G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W*, et al. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome*. J Pediatr. 2004;144(3):368-74.

Zenker M, Lehmann K, Schulz AL, Barth H, Hansmann D, Koenig R*, et al. Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations*. J Med Genet. 2007a;44(2):131-5.

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. 2007b;44(10):651-56.

# ANEXOS

## ANEXO I - Sequência dos *primers* para genes estudados

Pares de primers para amplificação do gene *PTPN11*

| Éxon | Primer sense* | Primer anti-sense* | DMSO | Tm (ºC) |
|---|---|---|---|---|
| 2 | AGCTGTGTTGTTGTGGA | CGAAATGCAGGCAGCA | sem | 59,6 |
| 3 | GGTAAAATCCGACGTGGA | AGCCTTTGGAGTCAGAGA | sem | 59,6 |
| 4 | GTGTTTAGGAGAGCTGA | GGTGTCTGTCTTCTGTCA | com | 56,7 |
| 5 | GAATAATGCTGCAGTGA | ACCTCTGTATGTTTGCA | sem | 48,2 |
| 6 | TCAACTGCTGTACTCGA | TCAAGTCTCTCAGGTCCA | sem | 53,4 |
| 7 | GAACATTTCCTAGGATGA | GGTACAGAGGTGCTAGGA | sem | 56,7 |
| 8 | GGCTGGGGAGTAACTGA | CTTTCAGGACATGAGGA | sem | 50,5 |
| 9 | TCCTTCCTCATGTCCTGA | CCTAAACATGGCCAA | com | 53,4 |
| 10 | TTCTGATCTCTTCCAGA | ATGCATGCATGTATGCA | sem | 53,4 |
| 11 | AAGCTTAGAACCGGGTGA | AAGAGCTAGGAGTGGGTA | sem | 59,6 |
| 12 | GCTTGGTTTTGAGTCTGA | CAACCTCTCTTCCCCAGA | sem | 56,7 |
| 13 | GCATTGTCTCTGAGTCCA | CCTGTCCTCCTGCTCA | sem | 56,7 |
| 14 | AACCATTGTCCCTCA | AAACCACCATGACCA | sem | 53,4 |
| 15 | GCCCAAAGAATGTAGTA | TAAGCAGGCAAGCAATT | sem | 53,4 |

*Prímers extraídos de Bertola *et al.*, 2006.

Pares de primers para amplificação do gene *KRAS*

| Éxon | Primer sense | Primer anti-sense | DMSO | Tm (ºC) |
|---|---|---|---|---|
| 2* | GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA | GAATGGTCCTGCACCAGTAA | com | 61.8 |
| 3* | TCAAGTCCTTTGCCCATTTT | TGCATGGCATTAGCAAAGAC | com | 61.9 |
| 4* | TTGTGGACAGGTTTTGAAAGA | AGAAGCAATGCCCTCTCAAG | com | 61.10 |
| 5** | CTCAAGCTCATAATCTCAAACTTCT | GTAGTTCTAAAGTGGTTGCCACC | com | 61.11 |
| 6** | GACAAAACACCTATGCGGATGA | GCTAACAGTCTGCATGGAGCA | com | 61.12 |

*Schubbert *et al.*, 2006; **Carta *et al.*, 2006

## ANEXO I - Sequência dos *primers* para genes estudados (continuação)

Pares de primers para amplificação do gene *SOS1*

| Éxon | Primer sense | Primer anti-sense | DMSO | Tm (ºC) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | CTGTTCCGCGCTGCGAGC | CGAGACCGGGAAGAAAGACG | com | 67.3 |
| 2 | TGCCCGGCCACAAACCCAC | CCCTGTTCACTGACATTACAACC | sem | 59.6 - 65.0 |
| 3 | CAGGATGTGATATTCCCCCTAG | CCTTCTCACCACATAAATCTCTGG | sem | 61.8 - 65.0 |
| 4 | GTTGGTAAGCACAGGCCTC | CTGGAGATATTCCCCAACAC | sem | 61.8 |
| 5 | CAGAGAACTTAGAGCATTTCAC | GTGATCATGAATTAAGTCCCAC | sem | 56.7 - 65.0 |
| 6 | TGCAAATTGTACACCTTTGCAG | AGCTGGAAAGAAGTAAGACTC | com | 61.8 |
| 7 | ATTGTGCTCGCATAGTCGTG | TTCAGACATTGTACATCTTCAT | sem | 45.0 - 48.2 |
| 8 | CTGGGGCAGCACTTTATTTG | AAATTCACACTTGAATATGTTA | sem | 45.0 - 59.6 |
| 9 | GCCTGTCACAAGATATAACCC | GAGGGAACTGGGATCCCTG | sem | 63.4 - 65.0 |
| 10 | CATGAGCTCTAGGTTTTCTGTCA | CACAATAAACCCATGCAGGA | sem | 60.7 - 64.6 |
| 11 | GTCCAAAGCCTTCTACTTGGC | GAAAAGGATCTTAGCTCAATCTC | com | 50.5 |
| 12 | GACTGGTGAAAACGTTTGTGG | CTCCTTGTTTGGGAAAGGTCC | com | 56.7 |
| 13 | CAAACAAGGAGAGGGGTGAC | TACTGAGCCCCAATGACATC | com | 56.7 - 59.6 |
| 14 | GCAAAGATACATTCAGGTGT | TGCCTGGCCTTATTACTAG | sem | 56.7 - 65.0 |
| 15 | GTTTTCACAGACCTTTCTGTTGG | GACAGAGCAAAACTCCGTCTC | sem | 59.6 |
| 16 | TTATACTATCGCCACCCCCCTA | CTACTGAAAAGACAAATGAG | com | 53.4 - 56.7 |
| 17 | GGGCGTTTCTGTTAGCCTAG | TTCTAAAGGGCTTCAGGTGC | sem | 59.6 |
| 18 | GGCAACTGAGATGGTACAGTG | CTCCCCTATAAAATAAACCTGCC | sem | 59.6 |
| 19 | GGCAGGTTTATTTTATAGGGGAG | GGAAGTGGGATATTCCTGGAC | sem | 56.7 - 64.6 |
| 21 | CTTCTCAAAAGTAAGTAGTAA | GTACCAATGCTGCCAGACCC | sem | 53.4 |
| 22 | GTCTGCATGCTTTTATGGCAG | GAGAACTAAACTAGACAGCCG | sem | 61.8 - 65 |
| 20a | TAGCTGAATTTTACCAGGCAC | CTGTGGTACTGGAAGCACCAG | sem | 56.7 - 65 |
| 20b | CCACACCTCTGCAGCAGGAG | GTTGGTGGAGTTTAGAATTTGTC | sem | 56.7 - 65 |
| 23a | TAGCATCCTGCCAATAGCATG | GTGCCGTGAGGAGAAGGTG | sem | 61.8 - 65 |
| 23b | CCACCACGAGAACCTGTGAG | GCTGGCACATTCAGTGCATCC | com | 61.8 - 65 |

Para o desenho das sequencias dos pares de primers, foi utilizado o programa *Primer 3 (Rozen et al., 2000)*.

## ANEXO I - Sequência dos *primers* para genes estudados (continuação)

Pares de primers para amplificação do gene *RAF1*

| Éxon | Primer sense | Primer anti-sense | DMSO | Tm (ºC) |
|---|---|---|---|---|
| 7 | CAAATATGTACTTGAAAGACTTCACCA | AAAACTCTGAAATAAGTATCAACCTCA | sem | 60 |
| 14 | TGACCATTCTTTTGAAACCAGA | AGGCATTCCTTTTGCCCTAT | sem | 60 |
| 17 | TGAGACACAGCTAATGAGAGCA | CTGCTGGCTTCTCCTCCTC | sem | 60 |

Para o desenho das sequencias dos pares de primers, foi utilizado o programa *Primer 3* (Rozen *et al.*, 2000).

Pares de primers para amplificação do gene *HRAS*

| Éxon | Primer sense | Primer anti-sense | DMSO | Tm (ºC) |
|---|---|---|---|---|
| 2 | CAGGAGACCCTGTAGGAGGA | AGCTGCTGGCACCTGGAC | com | 63.4 |
| 3 | AGGGAGAGGCTGGCTGTGTG | TCCAGGACATGCGCAGAGAG | com | 67.4 |
| 4 | TCCTCTCTGCGCATGTCCTG | GCCCTGTGTCAAGGGAGAGG | com | 63.4 |
| 5 | GCTCTCCACCCCACAGCTA | CGTCCCGGGAGACTTACAG | com | 59.6 |
| 6 | ACAGCAGGGAGCCCCtCAC | CGGTGGCATTTGGGATGTTC | sem | 69.6 |

Para o desenho das sequencias dos pares de primers, foi utilizado o programa *Primer 3* (Rozen *et al.*, 2000).

Pares de primers para amplificação do gene *BRAF*

| Éxon | Primer sense | Primer anti-sense | DMSO | Tm (ºC) |
|---|---|---|---|---|
| 6 | ACCCCCGGTTTTCATTTTAT | TGGAAGAAAAACCCTCACAGA | sem | 45,5 - 56,7 |
| 11 | AAGGGGATCTCTTCCTGTATCC | GAAACTTTTGGAGGAGTCCTGA | sem | 50,5 - 65 |
| 12 | TGGTATGGAGTTAGGGCTATGA | AGTTGCTACCACTGGGAACC | sem | 53,4 - 65,0 |
| 14 | TTCGAGGCCAGAGTCCTTTA | ACATGCATGCACAATCCTTT | sem | 50,5 - 65,0 |
| 15 | GCT TGC TCT GAT AGG AAA ATG AG | TTT CTA GTA ACT CAG CAG CAT CTC | sem | 52 |
| 16 | TGGTAAAAGCATTGCTCTAGGA | CTTCACGCTTACCCAGGAGT | com | 48,2 - 53,4 |

Para o desenho das sequencias dos pares de primers, foi utilizado o programa *Primer 3* (Rozen *et al.*, 2000).

Pares de primers para amplificação do gene *SHOC2*

| Éxon | Primer sense | Primer anti-sense | DMSO | Tm (ºC) |
|---|---|---|---|---|
| 2 | CAGATGGATGTTACTCCATG | CTCTTGGATAAGTCCAAACG | sem | 59,6 |

Para o desenho das sequencias dos pares de primers, foi utilizado o programa *Primer 3* (Rozen *et al.*, 2000).

## ANEXO II - Artigos Relacionados a este Projeto

### ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1) **Brasil AS**, Malaquias AC, Wanderley LT, Kim CA, Krieger JE, Jorge AA, Pereira AC, Bertola DR. Co-occurring *PTPN11* and *SOS1* gene mutations in Noonan syndrome: does this predict a more severe phenotype? Arq Bras Endocrinol Metabol. 2010. Nov;54(8):717-22.

2) da Rocha Pitta Marin L, Bezerra Gaspar Carvalho da Silva FT, Ferreira de Sá LC, **Salem Brasil A**, Pereira A, Mosca Furquim I, Kim CA, Romeo Bertola D. Ocular manifestations of Noonan syndrome. Ophthalmic Genet. Aug 4. 2011. [Epub ahead of print].

3) Bertola DR, Pereira A, **Brasil AS**, Suzuki L, Leite C, Falzoni R, Tammuri U, Poplawski A, Janowiski K, Kim C, Messiaen L. Multiple, diffuse schwannomas in a RASopathy phenotype patient with germline *KRAS* mutation: a causal relationship? Clin Genet. 2011. [Epub ahead of print].

### ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

4) Quaio CRDC, Carvalho JF, Silva CAA, Bueno C, **Brasil AS**, Pereira AC, Jorge AAL, Malaquias AC, Kim CA, Bertola DR. Autoimmune diseases and multiple autoantibodies in a cohort of 42 patients with molecularly confirmed RASopathy. Am J Med Genet. In press.

5) **Brasil AS**, Malaquias, AC, Kim CA, Krieger JE, Jorge AAL, Pereira AC, Bertola DR. KRAS gene mutations in Noonan syndrome familial cases cluster in the vicinity of the switch II region of the G-domain: report of a family with additional findings of craniosynostosis and ectodermal defects. Am J Med Genet. In press.

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 Brasil[1], Alexsandra C. Malaquias[2], Luciana Turolla Wanderley[1], Chong Ae Kim[1], José Eduardo Krieger[3], Alexander A. L. Jorge[4], Alexandre C. Pereira[3], Débora Romeo Bertola[1]

## 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

[1] Genetics Unit, Children's Institute, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil
[2] Endocrinology of Development Unit, Hormone and Molecular Genetics Laboratory, LIM/42, HC-FMUSP, Sao Paulo, SP, Brazil
[3] Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart's Institute (InCor), HC-FMUSP, Sao Paulo, SP, Brazil
[4] Endocrinology-Genetics Unit – LIM/25, Discipline of Endocrinology, HC-FMUSP, Sao Paulo, SP, Brazil

## 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

**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)].

Copyright © AE&M todos os direitos reservados



6)

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 | *PTPN11* | 29-70 | (4,12) |
| 2p22.1 | *SOS1* | 17[a]-28[a] | (9,11) |
| 3p25.1 | *RAF1* | 9[a]-17[b] | (6,7) |
| 12p12.1 | *KRAS* | 2[a] -6[b] | (3,5) |

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

Copyright © 2010 Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

## 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 supravalvar 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); hepatoesplenomegaly 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 PrismTM 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 comparative 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* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *PTPN11* | 8 | c.A1121G | p.N308S | Yes[a] | Probably damaging | Conserved |
| *SOS1* | 10 | c.A1654G | p.R552G | Yes[b] | Probably damaging | Conserved |
| *SOS1* | 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 *(PTPN11)* and p.R552G *(SOS1)* | p.N308S *(PTPN11)* | p.R552G *(SOS1)* |
|---|---|---|---|
| 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, HDS-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 pR552G 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

Copyright © AE&M Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

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 IJ, Mendonca 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, Gillessen-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 LEOPARD 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, Buheitel 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, 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;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.

Copyright © AE Associação Médica Brasileira

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, Slhessarenko 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 sindrome 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, Bierich 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.

*Ophthalmic Genetics*, 00(00), 000–000, 2011
Copyright © 2011 Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN: 1381-6810 print/ 1744-5094 online
DOI: 10.3109/13816810.2011.593606

informa
healthcare

RESEARCH REPORT

# Ocular manifestations of Noonan syndrome

AQ1 Lenina da Rocha Pitta Marin[1], Felipe Theodoro Bezerra Gaspar Carvalho da Silva[2], Luís Carlos Ferreira de Sá[3], Amanda Salem Brasil[3], Alexandre Pereira[4], Isabel Mosca Furquim[3], Chong Ae Kim[3], and Débora Romeo Bertola[3]

*[1]Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, [2]Department of Ophthalmology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, [3]Unidade de Genética do Instituto da Criança, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, and [4]InCor, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

UNCORRECTED PROOF

## ABSTRACT

*Purpose:* To describe the ophthalmological characteristics in a group of Noonan syndrome patients with proven mutations in the *PTPN11* gene.

*Methods:* Thirty-five Noonan syndrome patients with *PTPN11* gene mutations underwent ophthalmological exams, which consisted of external inspection, slit-lamp biomicroscopy examination and an ophthalmoscopic examination after instillation of 1.0% tropicamide or 1.0% cyclopentolate.

*Results:* All 35 patients had at least one abnormality upon ophthalmological examination. The eyelid and external eye abnormalities were the prevailing features, followed by prominent corneal nerves on slit-lamp exam. Fundus changes were detected in 8% of the subjects, mainly associated with high myopia. No statistically significant differences were observed among the patients presenting specific mutations in the *PTPN11* gene.

*Conclusions:* The current study further supports the finding that ocular symptoms account for a large fraction of the clinical manifestations of NS. Additional characteristics are described here. The roles for the various mutations of *PTPN11* in ocular development are yet to be established.

**Keywords:** Noonan syndrome, PTPN11, ocular, ophthalmological characteristics, eye

## INTRODUCTION

Noonan syndrome (NS) has an estimated incidence that ranges from 1:1000 to 1:2500 live births and an autosomal dominant pattern of inheritance.[1] This disorder is characterized by short stature, congenital heart defects (particularly pulmonary valve stenosis and hypertrophic cardiomyopathy) and facial dysmorphism (inverted triangular face, hypertelorism, ptosis, downslanting palpebral fissures, and low-set posterior rotated ears with a thick helix).[2] Other common manifestations include webbed neck, thoracic deformities, cryptorchidism, developmental delay of variable degree, bleeding diathesis and lymphedema.[3] NS is a genetically heterogeneous disorder caused by mutations in genes of the RAS/MAPK signaling pathway, including the *PTPN11*, *KRAS*, *SOS1*, *SHOC2* and *RAF1* genes.[4,5] Mutations of the *PTPN11* gene are found in approximately 50% of typical patients.[6,7]

Few reports addressing the ophthalmological aspects of NS are found in the literature, the vast majority being limited to case reports. Lee[8] described ophthalmological findings for 58 patients fulfilling clinical criteria for NS, 95% of whom had at least one ocular abnormality. The majority of patients (63%) had anterior segment changes.

A variant of NS may present with multiple lentigines. Patients with NS with multiple lentigines carry mutations in the genes of the same signaling pathway as NS and present with a similar phenotype to NS, with the addition of ECG conduction abnormalities, multiple lentigines, café-au-lait spots, obstructive cardiomyopathy and sensorineural hearing deficits, among other findings.[9] Alfieri[9] studied visual function and visuoperceptual abilities in individuals with NS and NS with multiple lentigines who had mutations in the *PTPN11*, *SOS1* and *RAF1* genes. Of the 24 subjects in the study by Alfieri,[9] 83% were identified as having

Received 18 January 2011; revised 18 May 2011; accepted 30 May 2011
Correspondence: Lenina da Rocha Pitta Marin, Avenida Celso Garcia, 5885, apto 84 bloco 11 CEP: 03063000 São Paulo, SP, Brasil. Tel: +55 11 22968818. E-mail: lenirpmarin@gmail.com

abnormalities. Among 10 patients with NS and proven mutations of the *PTPN11* gene, two had normal ocular motility, fundoscopy and refraction and only one had normal visual function. Thus, carriers of mutations of the *PTPN11* gene demonstrated a relatively lower prevalence of ocular abnormalities. However, this finding may be attributed to the relatively small sample size.

Thus, the current study aims to establish the prevalence of mutations of the *PTPN11* gene in Brazilian patients with NS, estimate the prevalence of ocular abnormalities and to explore genotype-phenotype correlations in this subset of patients.

## MATERIALS AND METHODS

Patients were evaluated at the Clinical Genetics Unit of the Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo. Subjects were examined by a clinical geneticist with experience in NS, and their diagnoses were based on clinical features according to the criteria of van der Burgt[10] and confirmed by molecular analysis of *PTPN11*. Those who did not harbor a *PTPN11* mutation were excluded from the study. They underwent an ophthalmological exam that consisted of external inspection, slit-lamp biomicroscopy examination and an ophthalmoscopic examination after instillation of1.0% tropicamide or 1.0% cyclopentolate. Hypertelorism was defined as an interpupillary distance outside the 97% normalcy range for patients' age, taken from the chart proposed by Feingold.[11] The interpupillary distance was calculated based on inner canthal and outer canthal measurements. A statistical analysis was performed using Fisher's exact test, with a significance of $P < 0.05$.

## RESULTS

The final cohort consisted of 35 patients (13 females and 22 males) with a proven *PTPN11* gene mutation, ranging in age from 4 months to 40 years with a mean age of 12 years and 11 months and a median age of 8 years and 1 month. All of the 35 patients had at least one abnormal parameter and 11% of them had three or more abnormal parameters. Abnormalities of the anterior segment, posterior segment or strabismus were detected in 66% of the patients (Table 1).

External ophthalmological features were identified in 34 (97%) patients; 26 of the 35 patients (74%) had downslanting palpebral fissures, 20 had hypertelorism (57%), 18 patients (51%) had ptosis and 9 patients (26%) had proptosis. Strabismus was disclosed in five patients– three with esotropia and two with exotropic strabismus. Motility was normal in the case of a patient with anisometropia.

Fundus changes were detected in three patients (8%), comprising degenerative changes secondary to high myopia, such as myopic choroidosis, posterior vitreous detachment and optic disc excavation ($0.7 \times 0.8$ mm RE e $0.7 \times 0.7$ mm LE) suggestive of glaucoma. Further analysis disclosed normal intraocular pressure, discarding this diagnosis.

Slit-lamp biomicroscopy revealed abnormalities in 20 cases (57%). The most prevalent anterior segment finding, prominent corneal nerves, was detected in 51% of all cases. Posterior embryotoxon, microcornea, traumatic leukoma, punctiform corneal opacities (punctate keratitis– most probably sequellae of adenoviral conjunctivitis) and dilated episcleral vessels were also individually recorded in five patients.

In order to establish a genotype-phenotype correlation, we compared the ocular profiles of our cohort in accordance to the mutation found in the gene and no statistical difference was obtained between the groups.

## DISCUSSION

In spite of being a relatively frequent disorder, the number of studies addressing ophthalmological aspects of NS is surprisingly small. Only one other study has assessed ocular manifestations of NS in patients with a proven molecular diagnosis (Alfieri[9]). In the former, the authors focused on aspects of visual function and visual perceptual abilities that are involved in everyday life performance and reported that a high percentage of patients showed impairment in these functions. A previous study of 58 patients was performed before the molecular basis of NS was revealed.[8] Our study screened a relatively large cohort of NS patients with proven *PTPN11* mutations, looking for periocular as well as anterior and posterior segment ocular abnormalities.

Our findings are in agreement with the current literature, namely that ocular abnormalities are commonly observed in NS (83–100%)[9] and that, among them, eyelid and external eye abnormalities are the prevailing features. These include downslanting palpebral fissures, hypertelorism, ptosis and proptosis, listed in order of decreasing prevalence. These external ophthalmological features are important characteristics that lead to the specific *gestalt* of NS.

Contrary to what Lee [8] found in his study, in which hypertelorism was the most frequent ocular manifestation, we found that downslanting palpebral fissures were more prevalent. It is possible that different methodological approaches led to this discrepancy (Table 1).

Ptosis is a common complaint in this group of patients and frequently requires an ophthalmological referral. This condition was present in 51% of our cohort, similar to that observed in the study by Lee.[8]

Among the anterior segment abnormalities, prominent corneal nerves are by far the most common eye

UNCORRECTED PROOF

TABLE 1 Ocular findings in NS patients in the present study compared to two previously published studies.

| Ocular findings | Present study *n*/total (%) | Lee[8] *n*/total (%) | Alfieri[9] *n*/total (%) |
|---|---|---|---|
| External features | 34/35 (97) | - | 2/10 (20) |
| Hypertelorism | 20/35 (57) | 43/58 (74) | - |
| Downslanting palpebral fissures | 26/35 (74) | 22/58 (38) | - |
| Ptosis | 18/35 (51) | 22/56 (48) | 1/10 (10) |
| Proptosis | 9/35 (26) | 1/56 (2) | 1/10 (10) |
| Strabismus | 5/35 (14) | 28/58 (48) | 7/10 (70) |
| Exotropic | 2/35 (6) | 10/58 (17) | 4/10 (40) |
| Esotropic | 3/35 (8) | 13/58 (22) | 3/10 (30) |
| Mixed | 0 | 1/58 (2) | 0 |
| Vertical | 0 | 4/58 (7) | 0 |
| Nystagmus | 0 | 5/58 (9) | 3/10 (30) |
| Refractive errors | - | 33/57 (61) | 6/10 (60) |
| Amblyopia | - | 18/55 (33) | - |
| Posterior segment abnormalities | 3/35 (8) | 10/51 (20) | 2/10 (20) |
| Optic nerve excavation | 1/35 (3) | 0 | 1/10 (10) |
| Myopic fundus | 2/35 (3) | 0 | 0 |
| Coloboma disc or retinal | 0 | 2/51 (4) | 0 |
| Swollen discs/disc drusen | 0 | 2/51 (4) | 0 |
| Myelinated nerves | 0 | 1/51 (2) | 0 |
| Optic disc hypoplasia | 0 | 2/51 (4) | 0 |
| Situs inversus | 0 | 1/51 (2) | 0 |
| Tortuous vessels | 0 | 3/51 (6) | 0 |
| Optic nerve pallor | 0 | 0 | 1/10 (10) |
| VEP* reduced | 0 | 0 | 1/10 (10) |
| Anterior segment abnormalities | 20/35 (57) | 30/48 (63) | - |
| Prominent corneal nerves | 18/35 (51) | 22/48 (46) | - |
| Traumatic leukoma | 1/35 (3) | 0 | - |
| Microcornea | 1/35 (3) | 0 | - |
| Posterior embriotoxon | 1/35 (3) | 0 | - |
| Dilated episcleral vessels | 1/35 (3) | 0 | - |
| Corneal opacity | 1/35 (3) | 2/48 (4) | - |
| Panuveitis | 0 | 1/48 (2) | - |
| Corneal pannus formation | 0 | 4/48 (8) | - |
| Peripheral sclero-cornea | 0 | 1/48 (2) | - |
| Cataract | 0 | 1/53 (2) | - |
| Persistent pupillary membrane | 0 | 1/48 (2) | - |
| Marked lens vacuolation | 0 | 3/53 (6) | - |

*VEP, visual-evoked potentials

finding. Although not sight-threatening, the presence of prominent corneal nerves may assist in the diagnosis of NS. Corneal opacity was previously found in two patients with NS.[8] Microcornea and posterior embriotoxon were also previously described in isolated cases.[12,13] Dilated episcleral vessels, observed in one patient, are usually an indication of orbital stenosis.

A limitation of our study is the lack of a systematic refraction. However, strabismus was identified in 14% of the subjects and no cases of nystagmus were detected, frequencies lower than those found in the literature (Table 1). Lee performed ophthalmologic examinations that revealed refractive errors in 61% of the patients, strabismus in 48%, amblyopia in 33%, and nystagmus in 9%.[8] Alfieri[9] had similar findings: refractive errors in 60% of NS patients with *PTPN11* mutations, strabismus in 70% and nystagmus in 30% (Table 1). It is possible that a genotype-phenotype correlation is responsible for the discrepancy observed in the frequency of nystagmus in our population compared to Alfieri, in which nystagmus was present in three out of 10 (30%) patients harboring *PTPN11* gene mutations and in two out of five (40%) in the group with mutations in the *SOS1* gene.[9] We hypothesize that nystagmus is a characteristic more prevalent in the group of patients harboring an *SOS1* gene mutation. Further descriptions of ophthalmological evaluations in patients with *SOS1* gene mutations will be important to validate this idea.

Our study detected fundus changes in 8% of subjects, prevalence similar to that found in the literature[9] (Table 1). Although not previously described, posterior vitreous detachment can occur prematurely in

© 2011 Informa Healthcare USA, Inc.

UNCORRECTED PROOF

TABLE 2 Total number of ocular findings in our cohort of NS patients according to the site of the mutation in the PTPN11 gene

| Exon | Mutations | Amino acid changes | Patients | Posterior segment | Anterior segment | Strabismus | External findings |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | c. 559G>C | p. G60A | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| | c.616A>G | p. Q79R | 3 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| | c.697A>C | p. D106A | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | c.598C>T | p.T73I | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | c.564T>G | p. Y62D | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| | c.568A>G | p. Y63C | 3 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 4 | c.797G>C | p. E139D | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| 7 | c.1224A>G | p. I282V | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | c.1216A>G | p. Y279C | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 8 | c.1234T>C | p. F285S | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | c.1302A>G | p. N308D | 7 | 0 | 4 | 1 | 7 |
| | c.1303A>G | p. N308S | 6 | 1 | 5 | 1 | 6 |
| 11 | c.1612C>T | p. T411M | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 13 | c.1851C>T | p. P491S | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | c.1909A>C | p. Q510P | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | c.1885C>T | p. S502L | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | c.1852C>A | p. P491H | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | c.1890A>G | p. M504V | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Total | 18 | | 35 | 3 | 20 | 5 | 34 |

cases of degenerative myopia, thus accounting for this finding described for the first time in our study. Other fundus findings in the current study were optic disc excavation– glaucoma suspect– and myopic fundus reinforcing the need for refraction. Previously described abnormalities of the optic disc such as hypoplasia, nerve head drusen, coloboma, optic disk with myelinated fibers[8] and optic disk pallor were not detected.[9]

The molecular analysis of the *PTPN11* gene in our cohort revealed mutations in exons 3, 4, 7, 8 and 13. Mutations in exons 3, 8 and 13 are responsible for 86% of the cases. This is in accordance to the literature, in which more than 80% of the mutations are located in these specific exons.[14] The majority of the mutations affect residues involved in the N-SH2/PTP interdomain binding network predicted to up-regulate SHP-2 physiological activation by impairing the switch between the active and inactive conformation without altering SHP-2's catalytic capability.[15] When using Fisher's exact test to compare the frequencies of the various ocular defects in specific mutations, no statistically significant difference was obtained (Table 2). Therefore, this study failed to show a specific genotype and ocular phenotype correlation associated with the *PTPN11* gene, perhaps due to the small number of patients in each category.

In the literature, there is also a lack of a precise genotype-phenotype correlation, with the exception of pulmonary stenosis, which seems to be more frequent in patients harboring *PTPN11* gene mutations. Moreover, the most frequent gene alteration (p.N308D) showed less necessity of special education.[14] Although the presence of a mutation in one gene is sufficient to cause the disease (monogenic disorder), the variable expressivity could be caused by the interaction with other genes and/or environmental factors, which precludes a more accurate genotype-phenotype correlation.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 08/50184-2.

***Declaration of interest:*** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

## REFERENCES

1. Nora JJ, Nora AH, Sinha AK, Spangler RD, Lubs HÁ,. The Ullrich-Noonan syndrome (Turner phenotype). Am J Dis Child, 1974;127:48–55.
2. Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, et al . Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. Pediatrics 2010;126(4):746–759.
3. Allanson JE. Noonan syndrome. J Med Genet 1987;24:9–13.
4. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. Nat Genet 2001;29:465–468.
5. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, et al. Germline KRAS mutation cause Noonan syndrome. Nat Genet 2006;38:331–336.
6. Bertola DR, Pereira AC, Albano LMJ, Oliveira PSL, Kim CA, Krieger JE. PTPN11 gene analysis in 74 Brazilian patients with Noonan syndrome or Noonan-like phenotype. Genet Test 2006;10:186–191.
7. Zenker M, Buheitel G, Rauch R, et al. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. J Pediatr 2004;144:368–374.
8. Lee NB, Kelly L, Sharland M. Ocular manifestations of Noonan syndrome. Eye 1992;6:328–334.

UNCORRECTED PROOF

9. Alfieri P, Cesarini L, Zampino G, et al. Visual function in Noonan and LEOPARD syndrome. Neuropediatrics 2008;39:335–340.
10. van der Burgt I, Berends E, Lommen E, et al . Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome. Am J Med Genet 1994;53(2):187–191.
11. Feingold M, Bossert WH. Normal values for selected physical parameters, an aid to syndrome delineation. Birth Defects 1974;10:000–000. AQ2
12. Ram SP, Krishna TN. Cardiopathy and ocular abnormalities in Noonan syndrome. Singapore Med J 1994 Aug;35(4):397–399.
13. Schwartz DE. Noonan's syndrome associated with ocular abnormalities. Am J Ophthalmol 1972 Jun;73(6):955–960.
14. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation and phenotypic heterogeneity. Am J Hum Genet 2002 Jun;70(6):1555–1563.
15. Gelb BD, Tartaglia M. Noonan syndrome and related disorders: dysregulated RAS-mitogen activated protein kinase signal transduction. Hum Mol Genet 2006 Oct 15;15(Spec No. 2):R220–226.

UNCORRECTED PROOF

© 2011 Informa Healthcare USA, Inc.

CLINICAL GENETICS An International Journal of Genetics, Molecular and Personalized Medicine

Clin Genet 2011
Printed in Singapore. All rights reserved

© 2011 John Wiley & Sons A/S
CLINICAL GENETICS
doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01764.x

## Letter to the Editor

# Multiple, diffuse schwannomas in a RASopathy phenotype patient with germline *KRAS* mutation: a causal relationship?

*To the Editor*:

RAS proto-oncogenes (*KRAS*, *HRAS* and *NRAS*) encode GTPases, and their role in cancer, as somatic mutations, is well known (1, 2). Germline mutations in genes within the RAS/MAPK signaling pathway are responsible for a group of phenotypically overlapping developmental disorders (RASopathies) (3), including Noonan syndrome (NS) and Noonan-related disorders: NS with multiple lentigines, cardio-facio-cutaneous syndrome and Costello syndrome (CS) (4). Tumor risk in RASopathies is not yet fully established, and more studies are needed (5, 6). NS patients harboring *PTPN11* germline mutations have a 3.5-fold increased risk compared to the general population (6).

CS patients carrying *HRAS* mutations have a higher incidence (approximately 15%) of certain solid tumors, especially rhabdomyosarcomas, and a screening surveillance protocol has been proposed (7, 8). Here, we describe the presence of multiple diffuse schwannomas in a patient harboring a germline *KRAS* mutation (p.K5E), previously reported on (9).

The proband is a 23-year-old female with clinical features compatible with a RASopathy phenotype (Fig. 1a). She was initially evaluated in our service at 8 years old. At the age of 22, she started to experience difficulty in relaxation of the hand muscles, fatigue, abdominal pain and nausea. Six months later, a superficial nodule in her forth right intercostal space was palpable. An exploratory magnetic resonance imaging (MRI) scan of her cranium, thorax and abdomen showed diffuse enlargement of all nerve roots of the spine, brachial plexus, radial, ulnar and median nerves, as well as masses on the retroperitoneum (Fig. 1b), suggesting an overgrowth of peripheral nerve sheaths, compatible with a schwannoma or neurofibroma. No brain abnormalities were found by MRI scanning. Histopathological and immunohistochemical analysis of an excised thoracic nodule were compatible with the diagnosis of schwannoma (Fig. 1c). Combining histological and MRI findings, our final diagnosis was multiple diffuse schwannomas.

In otherwise healthy patients, benign tumors of the peripheral nerve sheath typically occur singly. In rare cases malignant transformation occurs. The presence of multiple schwannomas in an individual suggests an underlying tumor predisposition syndrome, more particularly neurofibromatosis type II (NF2) or schwannomatosis (*SMARCB1*) (10). Comprehensive *NF2* and *SMARCB1* mutation analysis was performed on DNA extracted from blood and tumor. Analysis included sequencing of the entire coding region, dosage analysis by Multiplex Ligation Probe Assay and Loss of Heterozygosity analysis using 15 microsatellite markers along chromosome 22q. No pathogenic *NF2/SMARCB1* mutations were identified. A novel *NF2* benign intronic variant was identified in blood and tumor: c.886-15C>T. This alteration replaces a non-evolutionary conserved pyrimidine by another pyrimidine at the splice acceptor of exon 10 and was proven not to affect splicing through RNA analysis in blood, in agreement with results from *in silico* splice predictions. Thus, the co-occurrence of a *KRAS*-associated phenotype and NF2/schwannomatosis caused by mutations in *NF2* or *SMARCB1* genes is highly unlikely. Therefore, *KRAS* could be in itself the tumor predisposing gene leading to diffuse schwannomas in our patient. As it is known that *SMARCB1* mutations are only found in a minority of the *NF2*-negative schwannomatosis patients (11, 12), we further performed sequence analysis of all *KRAS* exons in eight *NF2/SMARCB1*-negative schwannomatosis patients, but no mutations were found, indicating that *KRAS* might not be a major contributing gene in *NF2/SMARCB1*-negative schwannomatosis patients. However, the presence of schwannoma has been reported previously in an NS and a CS patient, though this was prior to the identification of the genes causing these disorders (13, 14).

Exacerbated growth of peripheral nerve sheaths (neurofibromas) is also observed in neurofibromatosis type 1 patients carrying *NF1* mutations, another tumor suppressor gene of the RAS/MAPK pathway. Activation of this pathway regulates mTOR which is phosphoinositol 3′ kinase (PI3K) dependent, a critical effector pathway involved in disease pathogenesis (15). Although functional studies are not available for the mutation p.K5E found in our patient, a different gene

Letter to the Editor

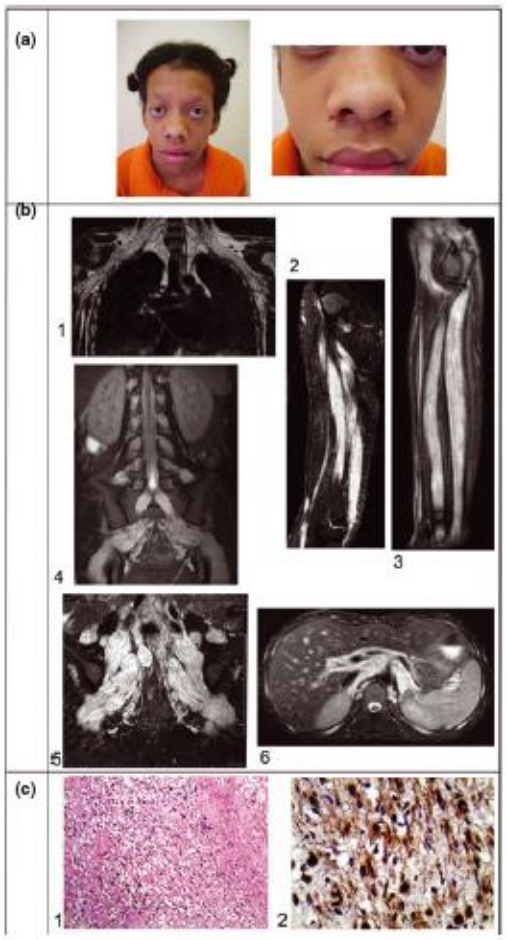



*Fig. 1.* (a) Frontal view of the patient at 18 years of age showing curly hair, sparse eyebrows, hypertelorism, proptosis, perinasal papillomata, thick lips and macrostomia. (b) Magnetic resonance images of the chest arm, forearm, spine and abdomen showing diffuse thickening of cervical nerve roots, brachial plexus, axilar, median, radial and ulnar nerves, spinal nerve roots, sciatic nerve as well as thickening of the tissue around porta hepatis and retroperitoneum. (c) Histopathological features of the intercostal nodule showing spindle-shaped Schwann cells with symplastic degenerative changes (hematoxylin and eosin stain, ×100) and difuse expression of S100 protein.

alteration affecting the same residue (p.K5N) showed a modestly higher activated state and a higher downstream signaling compared to KRAS$^{wt}$, indicating that this mutation impacts RAS function (16). We hypothesize that activation of this pathway could lead to the development of diffuse schwannomas in our patient.

This is the first documented patient harboring a *KRAS* gene mutation presenting with a solid tumor, which may expand the phenotypic spectrum of RAS/MAPK pathway genes. One NS patient with a *KRAS* mutation has developed juvenile myelomonocytic leukemia (17), a myeloproliferative disorder that has been repeatedly reported in NS patients carrying *PTPN11* gene mutations (18).

So far, *KRAS* germline mutations have been described in only 35 patients (19). All cases were sporadic with ages varying from 1.2 to 31 years (17, 19–25). A long-term follow-up is needed to fully uncover the risk of tumor development in this young population.

The presence of multiple schwannomas in a patient harboring a *KRAS* mutation has serious implications. We strongly recommend a lifelong close surveillance in patients harboring mutations in all genes of the RAS/MAPK signaling pathway, until more conclusive data about tumor risk in this population are available. This includes a careful physical examination, with special attention to complaints of pain, paresthesias, weakness, atrophy and palpable masses, as these are the major symptoms observed in individuals with schwannomas (26).

**Acknowledgements**

We thank Dr Alexsander Jorge and Ms Beatriz Marinho de Paula Mariani for technical support with the tumor sample. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – 08/50184-2.

*DR Bertola*[a]
*AC Pereira*[b]
*AS Brasil*[a]
*L Suzuki*[c]
*C Leite*[c]
*R Falzoni*[d]
*U Tannuri*[e]
*AB Poplawski*[f]
*KM Janowski*[f]
*CA Kim*[a]
*LM Messiaen*[a]
[a]Unidade de Genética, Instituto da Criança,
[b]InCor,
[c]Department of Radiology,
[d]Department of Pathology, and
[e]Department of Pediatrics Surgery, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, and
[f]Medical Genomics Laboratory, Department of Genetics, University of Alabama, Birmingham, AL, USA

**References**

1. Kratz CP, Niemeyer CM, Zenker M. An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development. J Mol Med 2007: 85: 227–235.
2. Huang JH, Simon SL, Nagpal S, Nelson PT, Zager EL. Management of patients with schwannomatosis: report of six cases and review of the literature. Surg Neurol 2004: 62: 353–361.
3. Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. Curr Opin Genet Dev 2009: 19: 230–236.
4. Tartaglia M, Zampino G, Gelb BD. Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis. Mol Syndromol 2010: 1: 2–26.
5. Kratz CP, Rapisuwon S, Reed H, Hasle H, Rosenberg PS. Cancer in Noonan, Costello, cardiofaciocutaneous and LEOPARD syndromes. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2011: 157: 83–89.
6. Jongmans MC, van der Burgt I, Hoogerbrugge PM et al. Cancer risk in patients with Noonan syndrome carrying a PTPN11 mutation. Eur J Hum Genet 2011: 19: 870–874.

7. Gripp KW, Scott CI Jr, Nicholson L et al. Five additional Costello syndrome patients with rhabdomyosarcoma: proposal for a tumor screening protocol. Am J Med Genet 2002: 108: 80–87.
8. Gripp KW. Tumor predisposition in Costello syndrome. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2005: 137C: 72–77.
9. Bertola DR, Pereira AC, Brasil AS, Albano LM, Kim CA, Krieger JE. Further evidence of genetic heterogeneity in Costello syndrome: involvement of the KRAS gene. J Hum Genet 2007: 52: 521–526.
10. Gonzalvo A, Fowler A, Cook RJ et al. Schwannomatosis, sporadic schwannomatosis, and familial schwannomatosis: a surgical series with long-term follow-up. J Neurosurg 2011: 114: 756–762.
11. Hadfield KD, Newman WG, Bowers NL et al. Molecular characterisation of SMARCB1 and NF2 in familial and sporadic schwannomatosis. J Med Genet 2008: 45: 332–339.
12. Sestini R, Bacci C, Provenzano A, Genuardi M, Papi L. Evidence of a four-hit mechanism involving SMARCB1 and NF2 in schwannomatosis-associated schwannomas. Hum Mutat 2008: 29: 227–231.
13. Kaplan MS, Opitz JM, Gosset FR. Noonan's syndrome. A case with elevated serum alkaline phosphatase levels and malignant schwannoma of the left forearm. Am J Dis Child 1968: 116: 359–366.
14. Suri M, Garrett C. Costello syndrome with acoustic neuroma and cataract. Is the Costello locus linked to neurofibromatosis type 2 on 22q? Clin Dysmorphol 1998: 7: 149–151.
15. Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K. The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. Proc Natl Acad Sci U S A 2005: 102: 8573–8578.
16. Gremer L, Merbitz-Zahradnik T, Dvorsky R et al. Germline KRAS mutations cause aberrant biochemical and physical properties leading to developmental disorders. Curr Opin Genet Dev 2009: 19: 230–236.
17. Kratz CP, Zampino G, Kriek M et al. Craniosynostosis in patients with Noonan syndrome caused by germline KRAS mutations. Am J Med Genet A 2009: 149A: 1036–1040.
18. Hasle H. Malignant diseases in Noonan syndrome and related disorders. Horm Res 2009: 72 (Suppl. 2): 8–14.
19. Zenker M, Lehmann K, Schulz AL et al. Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations. J Med Genet 2007: 44: 131–135.
20. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. Nat Genet 2006: 38: 331–336.
21. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G et al. Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. Am J Hum Genet 2006: 79: 129–135.
22. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. Nat Genet 2006: 38: 294–296.
23. Søvik O, Schubbert S, Houge G et al. De novo HRAS and KRAS mutations in two siblings with short stature and neuro-cardio-facio-cutaneous features. J Med Genet 2007: 44: e84.
24. Nyström AM, Ekvall S, Berglund E et al. Noonan and cardio-facio-cutaneous syndromes: two clinically and genetically overlapping disorders. J Med Genet 2008: 45: 500–506.
25. Lo FS, Lin JL, Kuo MT et al. Noonan syndrome caused by germline KRAS mutation in Taiwan: report of two patients and a review of the literature. Eur J Pediatr 2009: 168: 919–923.
26. Huang JH, Simon SL, Nagpal S, Nelson PT, Zager EL. Management of patients with schwannomatosis: report of six cases and review of the literature. Surg Neurol 2004: 62: 353–361.

*Correspondence*:
Débora R. Bertola
Instituto da Criança – HC/FMUSP
Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar
647 Cerqueira César
São Paulo CEP: 05403-900
Brazil
Tel.: +55 11 3069 8671
Fax: +55 11 3069 8503
e-mail: debora.bertola@icr.usp.br