AMANDA SALEM BRASIL

**Estudo dos genes *PTPN11* e *KRAS* em pacientes
afetados pela síndrome de Noonan e pelas
síndromes Noonan-like**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientadora: Dra. Débora Romeo Bertola

São Paulo

2009

*À minha família, em especial à minha
Mãe, pelo carinho e apoio incondicional,
renunciando de muitos momentos juntos
para que eu pudesse alcançar este título.*

À quem admiro e amo muito!

AGRADECIMENTOS

GOSTARIA DE EXPRESSAR MEU CARINHO E GRATIDÃO ÀS SEGUINTE PESSOAS:

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

À Dra. Débora Romeo Bertola pela orientação, apoio clínico e amizade.

À Dra. Chong Ae Kim pela oportunidade e orientação inicial.

Ao Dr. Alexandre da Costa Pereira, meu Tutor no InCor, pelos ensinamentos em genética molecular.

Ao Dr. José Eduardo Krieger pela viabilização do estudo molecular em seu laboratório.

À Dra. Berenice Mendonça pelas amostras sequenciadas em seu laboratório.

Ao Dr. Alexander Jorge e à Alessandra Malaquias pelo encaminhamento de alguns pacientes e participação neste projeto.

À Luciana Turolla pela amizade e auxílio no estudo molecular. Aos demais amigos do laboratório: Noely Ferreira, Alessandra Medeiros, Marcilene Floriano, Marilene Pavan, Diogo Biagi e Mariana Funari pelo apoio técnico.

À Sra. Maria de Lourdes Junqueira, à Sra. Adriana Bezerra, à Sra. Aparecida Medeiros e aos demais funcionários do ICr, do InCor e do PAMB pela cortesia e colaboração.

À FAPESP pelo financiamento deste projeto.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com:

Interpretação e descrição das variações genéticas: de acordo com *American College of Medical Genetics – ACMG* (Richards e cols., 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

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
NORMATIZAÇÃO ADOTADA	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS	2
1.2. INCIDÊNCIA	2
1.3. QUADRO CLÍNICO	3
1.4. PROGNÓSTICO E TRATAMENTO	4
1.5. DIAGNÓSTICO	5
1.6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	6
1.7. ESTUDO MOLECULAR NA SÍNDROME DE NOONAN E SÍNDROMES NOONAN-LIKE	8
1.7.1. <i>Gene PTPN11</i>	8
1.7.2. <i>Gene KRAS</i>	13
1.8. VIA RAS/MAPK (<i>MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE</i>)	17
1.9. CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO	20
1.9.1. <i>Gene PTPN11</i>	20
1.9.2. <i>Gene KRAS</i>	21
1.10. MUTAÇÕES GERMINATIVAS NOS GENES DA VIA RAS/MAPK RELACIONADAS AO RISCO DE NEOPLASIAS	21
2. OBJETIVOS	24
3. MÉTODOS	26

3.1. CASUÍSTICA.....	27
3.2. MÉTODOS	29
3.2.1. <i>Estudo Clínico</i>	29
3.2.2. <i>Estudo Molecular</i>	30
3.2.3. <i>Análise Estatística</i>	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1. GENE <i>PTPN11</i>	45
4.2. GENE <i>KRAS</i>	48
5. DISCUSSÃO.....	53
5.1. GENE <i>PTPN11</i>	55
5.2. GENE <i>KRAS</i>	59
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gene <i>PTPN11</i>	9
Figura 2 – Mutações já descritas no gene <i>PTPN11</i> em pacientes com síndrome de Noonan	10
Figura 3 – Gene <i>KRAS</i>	14
Figura 4 – O diagrama esquemático mostra a transdução de sinal da via RAS/MAPK, onde somente a via <i>RAF-MEK-ERK</i> é ilustrada	18
Figura 5 – Paciente com síndrome cardiofaciocutânea e mutação p.E532K no gene <i>PTPN11</i>	47
Figura 6 – Cromatograma ilustrando a troca c.436A>G, causando a mutação p.N85S no gene <i>KRAS</i> em um paciente com a síndrome de Noonan	49
Figura 7 – Paciente com síndrome de Noonan e as mutações p.N85S no gene <i>KRAS</i> e p.N308D no gene <i>PTPN11</i>	49
Figura 8 – Curva de denaturação por <i>High Resolution Melting</i> onde é possível observar diferentes padrões entre a sequência com a mutação p.N85S no gene <i>KRAS</i> e as sequências do grupo controle.....	50
Figura 9 – Cromatograma ilustrando a troca c.194A>G, causando a mutação p.K5E no gene <i>KRAS</i> em um paciente com a síndrome de Costello.....	50
Figura 10 – Fotografia da paciente com síndrome de Costello e a mutação K5E no gene <i>KRAS</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios diagnósticos da síndrome de Noonan	5
Tabela 2 – Mutações já descritas no gene <i>PTPN11</i> em pacientes com síndrome de LEOPARD	12
Tabela 3 – Artigos com pesquisa de mutação no gene <i>KRAS</i> em pacientes com as síndromes de Noonan e Noonan-like (sem mutação no gene <i>PTPN11</i>), e suas respectivas frequências encontradas	16
Tabela 4 – Mutações já descritas no gene <i>KRAS</i> em pacientes com síndrome de Noonan	16
Tabela 5 – Genes da via RAS/MAPK envolvidos nas síndromes de Noonan e Noonan-like	19
Tabela 6 – Estudo do gene <i>PTPN11</i>	28
Tabela 7 – Pares de <i>primers</i> utilizados para amplificação gene <i>PTPN11</i>	33
Tabela 8 – Pares de <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>KRAS</i>	33
Tabela 9 – <i>Primers</i> degenerados criados para genotipagem do grupo controle para polimorfismos no gene <i>KRAS</i>	39
Tabela 10 – Achados clínicos dos propósitos com síndrome de Noonan e com síndrome cardiofaciocutânea deste estudo	44
Tabela 11 – Mutações encontradas no gene <i>PTPN11</i> com sua localização na proteína, nos 71 novos pacientes com as síndromes de Noonan e Noonan-like	46
Tabela 12 – Resultado do estudo do gene <i>PTPN11</i> no total dos 125 probandos com as síndromes de Noonan e Noonan-like	48
Tabela 13 – Comparação da frequência genotípica dos polimorfismos encontrados no gene <i>KRAS</i> entre o grupo de estudo e o grupo controle	52
Tabela 14 – Quadro clínico dos pacientes com síndrome de Noonan deste estudo, com e sem mutação no gene <i>PTPN11</i>	57
Tabela 15 – Distribuição das diferentes cardiopatias encontradas em pacientes com síndrome de Noonan e com mutação em um dos três principais éxons envolvidos do gene <i>PTPN11</i>	57

Tabela 16 – Comparação entre pacientes com síndrome de Noonan sem mutação no gene *PTPN11* deste estudo e pacientes com síndrome de Noonan descritos na literatura sem mutação no gene *PTPN11* e com mutação no gene *KRAS* 60

Tabela 17 – Relação dos polimorfismos encontrados no gene *KRAS* em pacientes com síndrome de Noonan e com mutação no gene *PTPN11* 65

RESUMO

Brasil, AS. Estudo dos genes *PTPN11* e *KRAS* em pacientes afetados pela síndrome de Noonan e pelas síndromes Noonan-like [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009. 81p.

INTRODUÇÃO: a síndrome de Noonan apresenta herança autossômica dominante e é considerada uma doença relativamente frequente na população, com uma incidência estimada entre 1/1000 e 1/2500 nascidos vivos. Dentre os seus acometimentos destacam-se: dismorfismos faciais, baixa estatura, alterações cardíacas e criptorquia. A síndrome de Noonan é muito confundida com as síndromes Noonan-like devido à sobreposição dos achados clínicos. Estas, mais raras que a síndrome de Noonan, incluem as síndromes de LEOPARD, neurofibromatose-Noonan, cardiofaciocutânea e Costello. Atualmente sabe-se que tanto a síndrome de Noonan como as síndromes Noonan-like envolvem mutações em genes pertencentes à via de sinalização RAS-MAPK. Na síndrome de Noonan, pelo menos quatro genes desta via são responsáveis pelo fenótipo: *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS*. Mutações no gene *PTPN11*, o primeiro gene descrito em associação com a síndrome, são encontradas em aproximadamente 40% dos casos. O segundo gene descrito, o gene *KRAS*, é responsável por cerca de 2% dos casos que não apresentam mutações no gene *PTPN11*. Mutações no gene *KRAS* estão presentes em pacientes com síndrome de Noonan com retardo mental e/ou atraso no desenvolvimento mais acentuados e em pacientes com a síndrome cardiofaciocutânea cujo envolvimento ectodérmico é mais sutil. **OBJETIVO:** devido à recente associação do gene *KRAS* com a síndrome de Noonan e outras síndromes Noonan-like é importante: (1) testar a frequência de mutação neste gene em pacientes que apresentam ou não mutações no gene *PTPN11* e (2) tentar estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo mais precisa, o que permitirá a realização de um aconselhamento genético mais adequado. **MÉTODOS:** foram avaliados 95 probandos com síndrome de Noonan e 30 com síndromes Noonan-like. O estudo molecular foi realizado através da reação em cadeia de polimerase, seguida das reações de purificação e sequenciamento bidirecional. **RESULTADOS:** foram encontradas mutações no gene *PTPN11* em 20/46 (43%) pacientes com síndrome de Noonan, duas delas não descritas anteriormente. Relacionando o quadro clínico dos pacientes com síndrome de Noonan deste estudo, com e sem mutação no gene *PTPN11*, nota-se que os pacientes com mutação apresentam incidência significativamente maior de baixa estatura, de estenose pulmonar valvar e menor frequência de miocardiopatia hipertrófica. Uma mutação no gene *KRAS* foi encontrada em um paciente com síndrome de Costello, mutação esta ainda não relatada. Alterações gênicas em mais de um gene da via RAS-MAPK foram observadas em dois pacientes, sendo que uma delas em cada paciente não predizia um efeito fenotípico importante. Foram também encontrados três

polimorfismos no gene *KRAS*, porém com mesma frequência no grupo controle. A fim de verificar a influência destes polimorfismos, as principais características da síndrome de Noonan foram relacionadas entre os pacientes com esta síndrome que apresentavam mutação no gene *PTPN11* e comparadas quanto à presença ou ausência desses polimorfismos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada. CONCLUSÃO: Pacientes com síndrome de Noonan e mutações no gene *PTPN11* apresentaram uma maior incidência de baixa estatura e de estenose pulmonar valvar e uma menor incidência de miocardiopatia hipertrófica. O gene *KRAS*, até então relacionado às síndromes de Noonan e cardiofaciocutânea, mostrou-se também responsável pela síndrome de Costello. Tanto as alterações gênicas consideradas não patogênicas como os polimorfismos encontrados no gene *KRAS* parecem não ter uma grande influência sobre a variabilidade fenotípica na síndrome de Noonan. Contudo, não é possível afastar totalmente que estas alterações apresentem um efeito sutil e que, em conjunto com outras variações genéticas e/ou ambientais, tenham um efeito modulador.

Descritores: 1. Síndrome de Noonan; 2. Mutação; 3. Polimorfismo Genético

SUMMARY

Brasil, AS. Study of *PTPN11* and *KRAS* genes in patients with Noonan and Noonan-like syndromes [dissertation]. Sao Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009. 81p.

INTRODUCTION: Noonan syndrome shows autosomal dominant inheritance, and is a relatively frequent disease in the population, with an estimated incidence between 1/1000 and 1/2500 live births. The main clinical features are: facial dysmorphisms, short stature, cryptorchidism and cardiac abnormalities. The differential diagnosis between Noonan syndrome and Noonan-like syndromes is not always easy, due to the overlap of their clinical findings. The Noonan-like syndromes, more rare than the Noonan syndrome, include the LEOPARD syndrome, neurofibromatosis-Noonan, cardiofaciocutaneous and Costello. Currently it is known that Noonan syndrome and Noonan-like syndromes involve mutations in genes belonging to the RAS-MAPK signaling pathway. In Noonan syndrome, at least four genes of this pathway are responsible for the phenotype: *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* and *KRAS*. Mutations in *PTPN11*, the first gene described in association with this syndrome, are found in approximately 40% of cases. The second gene described, the *KRAS* gene, is responsible for about 2% of the cases that don't have mutations in the *PTPN11* gene. Mutations in the *KRAS* gene are present in patients with Noonan syndrome with mental retardation and/or developmental delay more pronounced and in patients with cardiofaciocutaneous syndrome whose ectodermal involvement is more subtle. **OBJECTIVE:** Due to the recent association of the *KRAS* gene with Noonan and Noonan-like syndromes is important: (1) to test the frequency of mutation in this gene in patients with or without mutations in *PTPN11* and (2) to establish a more precise genotype-phenotype correlation, allowing the realization of a more appropriate genetic counseling. **METHODS:** 95 probands with Noonan syndrome and 30 with Noonan-like syndromes were evaluated. The molecular analysis was performed by the polymerase chain reaction, followed by purification and bidirectional sequencing. **RESULTS:** *PTPN11* gene mutation was found in 20/46 (43%) patients with Noonan syndrome, two of them not previously described. By correlating the clinical features of patients with Noonan syndrome in this study, with or without mutations in the *PTPN11* gene, it was noted that patients with mutations have significantly higher incidence of short stature, pulmonary stenosis and lower incidence of hypertrophic cardiomyopathy. Mutations in *KRAS* gene were found in two patients – a patient with Noonan syndrome and the other with Costello syndrome. Gene alterations in more than one gene at the RAS-MAPK pathway were observed in two patients, but one of the mutations in each patient didn't predict a significant phenotypic effect. We also found three polymorphisms in the *KRAS* gene, but with the same frequency in the control group. To check the influence of these polymorphisms, the main

features of Noonan syndrome were related among patients with this syndrome who had mutations in the *PTPN11* gene and compared of the presence or absence of these polymorphisms. No statistically significant difference was found. CONCLUSION: Patients with Noonan syndrome and *PTPN11* gene mutation had a higher incidence of short stature and pulmonary valve stenosis and a lower incidence of hypertrophic cardiomyopathy. The *KRAS* gene, previously related to Noonan and cardiofaciocutaneous syndrome, was also responsible for Costello syndrome. Gene alterations considered as nonpathogenic and polymorphisms found in the *KRAS* gene seem to have a not great influence on the phenotypic variability in Noonan syndrome. However, it is not possible to completely rule out that these changes have a subtle effect and that, together with other genetic variations and/or environmental factors, may have a modulating effect.

Keywords: 1. Noonan syndrome; 2. Mutation; 3. Polymorphism, Genetic

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações históricas

A primeira descrição de um paciente afetado pela síndrome de Noonan (SN) foi atribuída a Kobylinski, em 1883, que descreveu como característica principal a presença do pescoço alado (Kobylinski, 1883).

Por várias décadas, ela foi confundida com a síndrome de Turner pela sobreposição dos achados clínicos e, somente em 1963, foi reconhecida como uma entidade distinta, por Noonan e Ehmke. Estes autores estudaram os achados clínicos associados a um grupo de pacientes com estenose pulmonar valvar (EPV).

1.2. Incidência

A síndrome de Noonan (SN) apresenta herança autossômica dominante e é considerada uma doença relativamente frequente na

população, com uma incidência estimada em 1/1000 a 1/2500 nascidos vivos (Nora e cols., 1974).

1.3. Quadro Clínico

O quadro clínico caracteriza-se por 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 alado, deformidade esternal, cardiopatia (estenose pulmonar valvar e miocardiopatia hipertrófica, principalmente), criptorquia nos meninos e distúrbios hematológicos (Noonan, 1994). 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 e cols., 1974). Atualmente tal característica clínica faz parte do espectro da síndrome de Noonan.

Há uma extrema variabilidade clínica inter e intra-familiar na síndrome (Bertola e cols., 2004). O fenótipo varia com a idade (Allanson, 1987),

podendo apresentar características faciais mais sutis no adulto, o que dificulta ainda mais o diagnóstico.

1.4. Prognóstico e tratamento

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 deficiência mental, 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 e cols., 2005; Money, Kalus, 1979).

A utilização do hormônio de crescimento tem sido indicada por alguns autores na tentativa de melhorar a estatura final destes pacientes, mas seu uso é ainda controverso (Ahmed e cols., 1991; Cotterill e cols., 1996).

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da SN baseia-se primariamente em uma suspeita clínica. Não há, entretanto, na síndrome, um sinal que seja patognomônico. É o conjunto de vários sinais que levará ao diagnóstico clínico. O critério diagnóstico mais utilizado é o de van der Burgt e cols. (1994), que estabelece o diagnóstico da SN baseado nas características apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Critérios diagnósticos da síndrome de Noonan (traduzido de van der Burgt e cols., 1994)

Características clínicas	A = maior	B = menor
Face	Típica	Sugestiva
Coração	EPV e/ou ECG típico	Outro defeito cardíaco
Estatura	<3º percentil	<10º percentil
Tórax	Pectus carinatum/excavatum	Tórax largo
História familiar	Parente de 1º grau com diagnóstico definitivo de SN	Parente de 1º grau com diagnóstico sugestivo de SN
Outros	Presença de: deficiência mental + criptorquia + displasia linfática no sexo masculino	Presença de: deficiência mental ou criptorquia ou displasia linfática no sexo masculino

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

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 e cols., 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 e cols., 1980), apresentam sobreposição do quadro clínico com a SN.

A SN também é muito confundida com as síndromes Noonan-like (SNL) devido à sobreposição dos achados clínicos. As SNL, mais raras que a SN, incluem as síndromes de LEOPARD, Neurofibromatose-Noonan, cardiofaciocutânea e Costello.

A **síndrome de LEOPARD** 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 e cols. (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 da neurofibromatose-Noonan (NFSN)**, caracterizada por manifestações clínicas tanto da neurofibromatose tipo 1 (NF1) quanto da SN, pode decorrer de um dos quatro mecanismos propostos: a) algumas características da SN fazem parte do espectro da NF1; b) algumas características da NF1 fazem parte do espectro da SN; c) a NFSN é uma doença distinta; d) co-ocorrência de ambas as doenças em um indivíduo (Opitz, Weaver, 1985).

A **síndrome cardiofaciocutânea (CFC)** foi descrita por Reynolds e cols. (1986) como uma nova síndrome com envolvimento cardio-facio-cutâneo e retardo mental. 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, sobrancelhas esparsas e lesões hiperqueratóticas; e) cardiopatia congênita; e f) esplenomegalia.

A **síndrome de Costello** 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 deficiência mental (Costello, 1977; 1996). As anomalias cardiovasculares mais comuns na doença incluem a comunicação interventricular, a estenose pulmonar valvar e a miocardiopatia hipertrófica (Siwik e cols., 1998).

1.7. Estudo molecular na síndrome de Noonan e Síndromes Noonan-like

1.7.1. Gene *PTPN11*

O primeiro gene responsável pela síndrome de Noonan – o gene *PTPN11* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor, type 11*) – foi identificado em 2001 (Tartaglia e cols., 2001).

O gene *PTPN11* está localizado em sentido *sense* no braço longo do cromossomo 12, na região 12q24.1. Com 91,18Kb de extensão, este gene é

composto por 16 éxons, onde o primeiro éxon contém uma região 5' não-traduzida, o códon iniciador ATG e alguns códons adicionais. O éxon 15 apresenta o códon de parada (*NCBI-refseq*) (Figura 1).

O gene *PTPN11* codifica a proteína SHP2 composta por 593 aminoácidos. Esta é uma proteína não-receptora, membro de uma pequena subfamília de proteínas citosólicas tirosina fosfatase (PTP) que participa na transdução de sinais múltiplos através de via RAS/MAPK.

Figura 1 – Gene *PTPN11* (traduzido de *NCBI-refseq*). A) Cromossomo: 12; Localização: 12q24.1; cada seta representa um gene e sua direção indica se o gene está posicionado na mesma orientação do cromossomo (*sense*) ou em orientação contrária ao cromossomo (*antisense*) - o gene *PTPN11* está em posição *sense*. B) Representação esquemática de éxons e íntrons do gene *PTPN11*

Atualmente, na literatura, mutações no gene *PTPN11* foram encontradas em 40% (246/ 608) dos casos de SN. Das mutações já descritas (Figura 2) as mais frequentes são: p.N308D (19%) e p.Y63C (10%) (Bertola e cols., 2004; Bertola e cols., 2006; Binder e cols., 2005; Danoviz e cols., 2006; Digilio e cols., 2002; Hung e cols., 2007; Ko e cols., 2008; Kosaki

e cols., 2002; Loh e cols., 2004; Maheshwari e cols., 2002; Musante e cols., 2003; Sarkozy e cols., 2003; Schollen e cols., 2003; Tartaglia e cols., 2001; Tartaglia e cols., 2002; Yoshida e cols., 2004; Zenker e cols., 2004).

Figura 2 – Mutações já descritas no gene *PTPN11* em pacientes com síndrome de Noonan (Bertola e cols., 2004; Bertola e cols., 2006; Binder e cols., 2005; Danoviz e cols., 2006; Digilio e cols., 2002; Hung e cols., 2007; Ko e cols., 2008; Kosaki e cols., 2002; Loh e cols., 2004; Maheshwari e cols., 2002; Musante e cols., 2003; Sarkozy e cols., 2003; Schollen e cols., 2003; Tartaglia e cols., 2001; Tartaglia e cols., 2002; Yoshida e cols., 2004; Zenker e cols., 2004)

Nas SNL (LEOPARD, CFC e SC), mutações no gene *PTPN11* foram encontradas somente em pacientes com a síndrome de LEOPARD (Digilio e cols., 2002; Ion e cols., 2002; Kavamura e cols., 2003). Nesta síndrome o gene *PTPN11* é o principal responsável pela doença. Atualmente encontram-se na literatura 96 casos com síndrome de LEOPARD avaliados para o gene *PTPN11* onde 86% (83 casos) apresentaram mutação (Tabela 2). Dentre as mutações já descritas, a p.Y279C e a p.T468M representam aproximadamente 80% dos casos (Bertola e cols., 2006; Conti e cols., 2003; Digilio e cols., 2006a; Digilio e cols., 2002; Digilio e cols., 2006b; Digilio e cols., 2004; Du-Thanh e cols., 2007; Froster e cols., 2003; Kalidas e cols., 2005; Keren e cols., 2004; Laux e cols., 2008; Legius e cols., 2002; Lehmann e cols., 2009; Osawa e cols., 2009; Paradisi e cols., 2005; Sarkozy e cols., 2004a; Sarkozy e cols., 2004b; Sarkozy e cols., 2003; Schrader e cols., 2009; Ucar e cols., 2006; Yoshida e cols., 2004).

Na NFSN, 94% dos casos apresentam mutação no gene *NF1* (De Luca e cols., 2005). Raros casos foram descritos com mutação tanto no gene *NF1* como no gene *PTPN11* (Bertola e cols., 2005; Thiel e cols., 2009).

Além das mutações, no homem já foram descritos 352 polimorfismos de um único nucleotídeo (*SNPs – single nucleotide polymorphisms*) (*NCBI-dbSNP*).

Tabela 2 – Mutações já descritas no gene *PTPN11* em pacientes com síndrome de LEOPARD (Bertola e cols., 2006; Conti e cols., 2003; Digilio e cols., 2006a; Digilio e cols., 2002; Digilio e cols., 2006b; Digilio e cols., 2004; Du-Thanh e cols., 2007; Froster e cols., 2003; Kalidas e cols., 2005; Keren e cols., 2004; Laux e cols., 2008; Legius e cols., 2002; Lehmann e cols., 2009; Osawa e cols., 2009; Paradisi e cols., 2005; Sarkozy e cols., 2004a; Sarkozy e cols., 2004b; Sarkozy e cols., 2003; Schrader e cols., 2009; Ucar e cols., 2006; Yoshida e cols., 2004)

Éxon	Mutação	Total n (%)
7	p.Y279C	39 (47)
7	p.Y279S	3
12	p.A461S	1
12	p.A461T	3
12	p.G464A	1
12	p.T468M	26 (31)
12	p.T468P	1
13	p.R498L	1
13	p.R498W	1
13	p.Q506P	2
13	p.Q510E	2
13	p.Q510P	3

O fato de se ter encontrado mutações no gene *PTPN11* em aproximadamente metade dos pacientes com diagnóstico clínico da SN sugere que haja heterogeneidade lócica com envolvimento de um ou mais genes adicionais.

Em 2005, descobriu-se que o gene *HRAS*, pertencente a mesma via de sinalização do gene *PTPN11*, era responsável por 90% dos casos de síndrome de Costello (Aoki e cols., 2005). Este fato sugeriu que outros genes também pertencentes a via RAS/MAPK poderiam estar envolvidos nas síndromes de Noonan e Noonan-like.

1.7.2. Gene *KRAS*

Em 2006, Schubbert e cols. 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*, o qual também faz parte da via de sinalização RAS/MAPK.

O gene *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma*) 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 gene *KRAS* está localizado em sentido *anti-sense* no braço curto do cromossomo 12, na região 12p12.1. Com 45,68 Kb de extensão, este gene é composto por 6 éxons, onde o éxon 1 não é traduzido. O éxon 2 contém uma pequena região 5' não-traduzida, o códon iniciador ATG e outros códons adicionais. Através de *splicing* alternativo é possível obter duas formas transcritas: *KRASA* e *KRASB* (isoformas A e B). Dessa forma, tanto o éxon 5 como o éxon 6 apresentam o códon de parada. Estas isoformas se diferem pela presença do éxon 5 em *KRASA* e do éxon 6 em *KRASB* (NCBI-refseq) (Figura 3).

Figura 3 – Gene *KRAS* (traduzido de NCBI-refseq). A) Cromossomo: 12; Localização: 12p12.1; cada seta representa um gene e sua direção indica se o gene está posicionado na mesma orientação do cromossomo (*sense*) ou em orientação contrária ao cromossomo (*antisense*) - o gene *KRAS* está em posição *antisense*. B) Representação esquemática de éxons e íntrons do gene *KRAS*, em suas duas isoformas

Plowman e cols. (2003) estudaram camundongos com deleção do éxon 5 responsável pela isoforma A do gene *KRAS* e demonstraram que, assim como nos genes *HRAS* e *NRAS*, esta isoforma é dispensável para o desenvolvimento normal, quando na presença da isoforma B do gene *KRAS* funcional. Além disso, embora mutações em *KRAS* afetando domínios compartilhados pelas duas isoformas possam causar doenças (ex.: SN, CFC e Costello), a identificação de mutações no éxon 6 (responsável pela isoforma B) com ganho de função é suficiente para patogênese da doença – evidenciando que *KRAS* isoforma B apresenta maior influência no desenvolvimento do embrião (Carta e cols., 2006).

O gene *KRAS* codifica a proteína p21 composta por 189 aminoácidos em *KRASA* e 188 aminoácidos em *KRASB*. Esta proteína pertence à família das proteínas RAS que participam na transdução de sinais múltiplos através de via RAS/MAPK a qual controla a proliferação celular, a diferenciação, a sobrevivência, a regulação molecular de GDP/GTP e a supressão tumoral (Schubbert e cols., 2007).

No trabalho de Schubbert e cols. (2006) a frequência de mutação encontrada no gene *KRAS* foi de 3% (5/174) para pacientes com SN e 8% (1/12) para pacientes com síndrome CFC. O quadro clínico nos afetados pela SN e com mutação no gene *KRAS* mostrou 100% (5/5) com face típica e 80% (4/5) com cardiopatia e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM). Um destes pacientes, o qual apresentou a mutação p,T58I, desenvolveu leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ).

Logo após o trabalho de Schubbert e cols. (2006), outros artigos relacionados ao estudo de gene *KRAS* na SN e nas SNL foram publicados. A Tabela 3 lista estes artigos por ordem cronológica de publicação, separados pela síndrome estudada.

Sabe-se que até o momento o gene *KRAS* já foi estudado em 880 pacientes (723 com SN e 157 com SNL). Destes, 36 pacientes apresentaram mutação, sendo: 22 pacientes com SN (tabela 4), 9 pacientes com síndrome CFC e 5 com síndrome de Costello (Carta e cols., 2006; Ferrero e cols.,

2008; Ko e cols., 2008; Lee e cols., 2007; Lo e cols., 2008b; Nava e cols., 2007; Nystrom e cols., 2008; Schubbert e cols., 2006; Zenker e cols., 2007).

Tabela 3 - Artigos com pesquisa de mutação no gene *KRAS* em pacientes com as síndromes de Noonan e Noonan-like (sem mutação no gene *PTPN11*), e suas respectivas frequências encontradas. (N) número de pacientes estudados; (Freq.) frequência de mutação no gene *KRAS*. (Carta e cols., 2006; Ferrero e cols., 2008; Ko e cols., 2008; Lee e cols., 2007; Lo e cols., 2008b; Nava e cols., 2007; Nystrom e cols., 2008; Schubbert e cols., 2006; Zenker e cols., 2007)

	N	Alteração	Freq.
SÍNDROME	Noonan		
<i>Scubbert et al., 2006</i>	174	5	3%
<i>Carta et al., 2006</i>	87	2	2%
<i>Zenker et al., 2007</i>	236	8	3%
<i>Lee, et al., 2007</i>	7	0	0%
<i>Nava et al., 2007</i>	70	4	6%
<i>Nyström et al., 2008</i>	23	0	0%
<i>Ferrero et al., 2008</i>	26	0	0%
<i>Lo, Fu-Sung et al., 2008</i>	57	2	4%
<i>Ko, Jung Min et al., 2008</i>	43	1	2%
SÍNDROME	Cardiofaciocutânea		
<i>Scubbert et al., 2006</i>	12	1	8%
<i>Niihori et al., 2006</i>	43	3	7%
<i>Carta et al., 2006</i>	8	0	0%
<i>Zenker et al., 2007</i>	21	2	10%
<i>Sovik et al., 2007</i>	1	1	100%
<i>Nava et al., 2007</i>	40	1	3%
<i>Nyström et al., 2008</i>	8	1	13%
SÍNDROME	Costello		
<i>Zenker et al., 2007</i>	3	2	67%
<i>Bertola et al., 2007</i>	1	1	100%
<i>Nava et al., 2007</i>	20	2	10%

Na SN a nas SNL já foram descritas 16 diferentes mutações no gene *KRAS*. Elas estão distribuídas pelos éxons 2 (54%), 3 (14%) e 6 (32%). Dos 22 casos de SN com mutação no gene *KRAS*, as mutações mais frequentes são a p.V14I (36%) e a p.D153V (19%) (Tabela 4). Além das mutações, no homem, já foram descritos 558 SNPs (*NCBI-dbSNP*).

Tabela 4 – Mutações já descritas no gene *KRAS* em pacientes com síndrome de Noonan (n=22) (Carta e cols., 2006; Ferrero e cols., 2008; Ko e cols., 2008; Lee e cols., 2007; Lo e cols., 2008b; Nava e cols., 2007; Nystrom e cols., 2008; Schubbert e cols., 2006; Zenker e cols., 2007)

Gene <i>KRAS</i>	éxon 2					éxon 3	éxon 6		
Mutação	p.V14I	p.Q22R	p.P34L	p.P34Q	p.I36M	p.T58I	p.V152G	p.D153V	p.F156I
Scubbert et al., 2006	3					1		1	
Carta et al., 2006							1	1	
Zenker et al., 2007	1	1	1	1	1			2	1
Nava et al., 2007	2					1			1
Lo, Fu-Sung et al., 2008	1				1				
Ko, Jung Min et al., 2008	1								
TOTAL (%)	8 (36)	1	1	1	2	2	1	4 (19)	2

1.8. Via RAS/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)

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

Conforme demonstrado na Figura 4, a via de sinalização se inicia através da ligação do fator de crescimento ao receptor da membrana plasmática (receptor de tirosina quinase) resultando na ativação de complexos receptores, que contém alguns adaptadores (Shc, Grb2, Gab e SHP-2). Estas proteínas recrutam SOS (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.

Figura 4 – O diagrama esquemático mostra a transdução de sinal da via RAS/MAPK, onde somente a via RAF-MEK-ERK é ilustrada. As síndromes e suas proteínas alteradas, associadas às SN e SNL, estão indicadas da seguinte forma: proteínas alteradas que apresentam ganho de função estão em verde, e as que apresentam uma perda de função estão em vermelho. Modificado de Gelb e Tartaglia (modificado de Gelb, Tartaglia, 2006)

RAS-GTP pode ativar diversas vias. A via RAS/RAF/MEK/ERK, além de ser uma via RAS/MAPK clássica, ativada por um fator de crescimento, que controla a proliferação, a diferenciação e a morte celular, esta via também está envolvida com as SN e SNL. A neurofibromina (proteína ativadora de GTPase – GAP) é capaz de converter RAS-GTP em RAS-GDP, interrompendo a sinalização.

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 5 apresenta os genes da via RAS/MAPK que estão envolvidos nas síndromes de Noonan e Noonan-like.

Tabela 5 – Genes da via RAS/MAPK envolvidos nas síndromes de Noonan e Noonan-like

Síndrome	Lócus	Gene Mutado	(%)	Referência
Noonan	12q24.1	<i>PTPN11</i>	29-60	Musante e cols., 2003; Zenker e cols., 2004
	2p22.1	<i>SOS1</i>	17*-28*	Tartaglia e cols., 2007; Zenker e cols., 2007
	3p25.1	<i>RAF1</i>	9**-33**	Pandit e cols., 2007; Razzaque e cols., 2007
	12p12.1	<i>KRAS</i>	2*-6**	Carta e cols., 2006; Nava e cols., 2007
	15q22.31	<i>MEK1</i>	4**	Nava e cols., 2007
	7q34	<i>BRAF</i>	2***	Sarkozy e cols., 2009
Costello	11p15.5	<i>HRAS</i>	92	Aoki e cols., 2005
	12p12.1	<i>KRAS</i>	7	Zenker e cols., 2007
CFC	7q34	<i>BRAF</i>	78	Rodriguez-Viciano e cols., 2006
	15q22.31	<i>MEK1</i>	9	Rodriguez-Viciano e cols., 2006
	19p13.3	<i>MEK2</i>	4	Rodriguez-Viciano e cols., 2006
	12p12.1	<i>KRAS</i>	3-10	Nava e cols., 2007; Zenker e cols., 2007
LEOPARD	12q24.1	<i>PTPN11</i>	91	Digilio e cols., 2002
	3p25.1	<i>RAF1</i>	3	Pandit e cols., 2007
	7q34	<i>BRAF</i>	1	Seishima e cols., 2007
NFSN	17q11.2	<i>NF1</i>	94	De Luca e cols., 2005
	12q24.1	<i>PTPN11</i>	<1	Bertola e cols., 2005

* 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*

Recentemente, novas denominações são sugeridas para as síndromes com mutação na cascata RAS/MAPK: **Síndromes RAS/MAPK** (Aoki e cols., 2008) e **RASopatias** (Tidyman, Rauen, 2009) são alguns exemplos.

1.9. Correlação genótipo-fenótipo

1.9.1. Gene *PTPN11*

Na casuística de Tartaglia e cols. (2002) pacientes com mutação no gene *PTPN11* apresentaram maior incidência de EPV e menor incidência de miocardiopatia hipertrófica (MIOCH).

Sarkozy e cols. (2003) sugeriram uma relação entre o tipo de cardiopatia e a localização da mutação no gene *PTPN11*: pacientes com comunicação inter-atrial (CIA) tendem a apresentar mutação no éxon 3 e dos sete casos com a mutação p.N308D e cardiopatia, seis apresentaram EPV.

Nos pacientes com mutação no gene *PTPN11*, Zenker e cols. (2004) não só encontraram um aumento de EPV, como também uma maior incidência de baixa estatura, deformidade torácica e hematomas frequentes.

Em 2005, Jongmans e col. observaram que as características clínicas mais frequente nos pacientes estudados com SN e mutação no gene *PTPN11* foi a face típica (86%) e a criptorquia (84%).

Tartaglia e cols. (2002) observaram que o fenótipo dos 17 pacientes com a mutação p.N308D não diferia do fenótipo dos casos com outro tipo de mutação (n=37), exceto pelo fato de que os pacientes com a mutação

p.N308D apresentaram um melhor desenvolvimento cognitivo, com uma menor necessidade de educação especial.

1.9.2. Gene *KRAS*

Embora a correlação genótipo-fenótipo ainda não esteja bem estabelecida para alterações no gene *KRAS*, alguns trabalhos mostram que pacientes com SN e com mutação neste gene apresentam maior incidência e grau de retardo mental (Zenker e cols., 2007). Na síndrome CFC há um menor envolvimento ectodérmico, principalmente a hiperqueratose folicular e a ictiose (Niihori e cols., 2006; Zenker e cols., 2007).

1.10. Mutações germinativas nos genes da via RAS/MAPK relacionadas ao risco de neoplasias

A descoberta que mutações germinativas nos genes *RAS* causam síndromes malformativas é um sinal de alerta para a possibilidade do desenvolvimento de neoplasias nesta população, uma vez que esses genes são sabidamente oncogênicos.

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 e cols., 2002; Zenker e cols., 2004), está envolvido em 35% dos pacientes com a leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) e, em uma menor porcentagem, com a leucemia linfocítica aguda (LLA) e a leucemia mielocítica aguda (LMA) (Kratz e cols., 2005). O gene *BRAF* – principal gene responsável pela síndrome CFC (Rodriguez-Viciano e cols., 2006) – quando mutado apresenta uma incidência de formação de tumor de até 50% para alguns tipos de câncer (Schubbert e cols., 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 e cols., 2006).

A relação entre mutações germinativas e a formação de neoplasias ainda não está bem definida. Entretanto, dentre as síndromes de Noonan e Noonan-like, a síndrome de Costello, cujo gene *HRAS* é responsável por 92% dos casos (Aoki e cols., 2005), é a que apresenta maior incidência de neoplasias: 7% a 21%. Os tumores mais frequentes descritos são o rabdomiossarcoma, neuroblastoma e carcinoma de bexiga (Gripp, 2005).

Na síndrome de Noonan, alguns trabalhos mostraram o desenvolvimento de tumores, em casos isolados, como: o neuroblastoma (Mutesa e cols., 2008), o schwannoma (Kaplan e cols., 1968), a LLA (Roti e

cols., 2006), a LMA (Tartaglia e cols., 2003) e o linfoma de Hodgkin (Lo e cols., 2008a). Alguns estudos sugerem que haja um risco aumentado para o desenvolvimento de LMMJ (Loh e cols., 2004; Tartaglia e cols., 2003). Pacientes com síndrome de Noonan e mutação tanto no gene *PTPN11* como no gene *KRAS* desenvolveram LMMJ. No gene *PTPN11* as mutações encontradas foram: p.D61N, p.D61G, p.Y62D, p.A72G, p.T73I, p.R498W, p.S502A, p.G503R e p.Q506P, sendo a p.T73I a mais frequente (Aoki e cols., 2008). Já no gene *KRAS*, apenas um paciente com a mutação p.T58I desenvolveu LMMJ (Schubbert e cols., 2006).

Há descrições de casos isolados de pacientes com síndrome de LEOPARD e mutações no gene *PTPN11* com desenvolvimento de neoplasias como: melanoma (Seishima e cols., 2007), LLA (Laux e cols., 2008) e LMA (Ucar e cols., 2006).

Na síndrome CFC há também relato de alguns casos isolados: hepatoblastoma em um paciente pós transplante cardíaco, com mutação no gene *MEK1* (Al-Rahawan e cols., 2007); e dois casos de leucemia linfocítica aguda (LLA), um deles com mutação no gene *BRAF* (Makita e cols., 2007; Niihori e cols., 2006).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Devido à importância do gene *PTPN11* e à recente associação do gene *KRAS* com a síndrome de Noonan e outras síndromes Noonan-like é importante:

- estimar a frequência de mutações no gene *KRAS* em pacientes que não apresentam mutações no gene *PTPN11*;
- estimar a frequência de mutação no gene *KRAS* em pacientes que apresentam mutações no gene *PTPN11*, na tentativa de estabelecer se a alteração em mais de um gene da via RAS/MAPK seria capaz de influenciar a variabilidade fenotípica entre pacientes de uma mesma síndrome;
- tentar estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo mais precisa, o que permitirá a realização de um aconselhamento genético mais adequado.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Trata-se de um estudo retrospectivo e prospectivo, em que o gene *KRAS* foi avaliado em 125 pacientes – 95 afetados pela síndrome de Noonan (três deles com LMCG) e 30 pelas síndromes Noonan-like (13CFC, 3SC, 11NFSN, 3LEOPARD), em acompanhamento no Ambulatório de Genética Clínica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr/HC/FMUSP).

Todos os pacientes com síndrome de Noonan incluídos neste estudo preenchem os critérios clínicos de van der Burgt e cols. (1994), de acordo com a Tabela 1.

Em alguns pacientes o estudo do gene *PTPN11* já havia sido realizado, conforme mostra a Tabela 6. Com isso, antes da análise do gene *KRAS*, o sequenciamento do gene *PTPN11* foi efetuado em 71 novos pacientes: 46 com SN e 25 com SNL.

Dos 125 propósitos estudados, 67 eram do sexo masculino e 58 do sexo feminino. A idade variou entre 2 e 45 anos, com média e mediana em torno de 14 anos (dados calculados para 30/09/2009). A recorrência da síndrome em um parente de primeiro grau foi observada em 20 casos (casos familiares), sendo três afetados pela síndrome NFSN, um pela síndrome de Costello e os 16 restantes pela SN (um deles com LMCG).

Tabela 6 – Estudo do gene *PTPN11*

Síndrome	Pacientes <u>com</u> mutação no <i>PTPN11</i> *	Pacientes <u>sem</u> mutação no <i>PTPN11</i> *	Pacientes novos	Total
Noonan	21	28	46	95
CFC	0	0	13	13
Costello	0	0	3	3
NFSN	1	1	9	11
LEOPARD	3	0	0	3
Total	54		71	125

* Bertola, 2006

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.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 08/50184-2). Os pacientes só foram

incluídos no estudo após a assinatura de um consentimento informado pelo responsável legal.

No caso dos pacientes com SN ou SNL que já estavam em acompanhamento no ambulatório de Genética e, portanto, foram previamente avaliados clínica e laboratorialmente para o gene *PTPN11*, os mesmos foram reconvocados para esclarecimento do atual estudo e obtenção do consentimento por escrito.

3.2. Métodos

3.2.1. Estudo Clínico

Os pacientes deste estudo foram avaliados na Unidade de Genética ICr/HC/FMUSP através de um protocolo que consiste em: anamnese, exame físico detalhado do propósito e dos parentes de primeiro grau (sempre que possível) e heredograma.

Os exames complementares solicitados incluíam: o estudo cardiológico com ecocardiograma e eletrecardiograma; a realização de uma ultrasonografia de abdome total; raio-X da coluna e idade óssea; estudos hematológicos com hemograma, coagulograma e dosagem do fator XI;

avaliação oftalmológica com fundo de olho e biomicroscopia; e estudo cromossômico com banda G do sangue periférico.

Todos os pacientes com SN incluídos neste estudo preenchem os critérios clínicos de van der Burgt e cols. (van der Burgt e cols., 1994), que leva em consideração as seguintes características: dismorfismos faciais, anomalia cardíaca, baixa estatura, deformidade esternal, história familiar positiva e outros achados, como a deficiência mental, criptorquia e displasia linfática (Tabela 1).

3.2.2. Estudo Molecular

O estudo molecular foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor/HC/FMUSP).

Inicialmente foi realizado o estudo molecular no propósito. No encontro de mutação, os pais foram convocados e lhes foi oferecida a pesquisa da mesma mutação a fim de estabelecer se ela ocorreu *de novo* ou foi herdada.

3.2.2.1. Extração de DNA a partir de sangue total

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 e cols. (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 °C. 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°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 °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 °C) e centrifugado a 4°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.

3.2.2.2. Reação em Cadeia de Polimerase

O gene *PTPN11* foi analisado em 71 novos pacientes (46 SN, 9 NFSN, 13 CFC e 3 CS). Para a amplificação do gene *PTPN11* (éxon 2 ao 15) foram utilizados os pares de *primers* já desenvolvidos pelo nosso grupo (Bertola, 2006), relacionados na Tabela 7.

O gene *KRAS* foi analisado em todos os pacientes (n = 125), através da amplificação dos 5 éxons codificantes (éxon 2 ao 6) – *primers* extraídos dos trabalhos de Schubbert e cols. (2006) e Carta e cols. (2006), relacionandos na Tabela 8.

Tabela 7 – Pares de *primers* utilizados para amplificação gene *PTPN11* (éxon 2 ao 15), seus respectivos produtos (corresponde ao tamanho da região amplificada, em pares de bases), e temperaturas de hibridização (Tm) (Bertola, 2006)

<i>PTPN11</i>	Sequência 5' - 3'	Produto (pb)	Tm (°C)
2F	AGCTGTGTTGTTGTGGA	287	59,6
2R	CGAAATGCAGGCAGCA		
3F	GGTAAATCCGACGTGGA	385	59,6
3R	AGCCTTTGGAGTCAGAGA		
4F	GTGTTTAGGAGAGCTGA	366	56,7
4R	GGTGTCTGTCTTCTGTCA		
5F	GAATAATGCTGCAGTGA	290	48,2
5R	ACCTCTGTATGTTTGCA		
6F	TCAACTGCTGTACTCGA	234	53,4
6R	TCAAGTCTCTCAGGTCCA		
7F	GAACATTTCTAGGATGA	271	56,7
7R	GGTACAGAGGTGCTAGGA		
8F	GGCTGGGGAGTAACTGA	244	50,5
8R	CTTTCAGGACATGAGGA		
9F	TCCTTCCTCATGTCCTGA	295	53,4
9R	CCTAAACATGGCCAA		
10F	TTCTGATCTCTTCCAGA	246	53,4
10R	ATGCATGCATGTATGCA		
11F	AAGCTTAGAACCGGGTGA	319	59,6
11R	AAGAGCTAGGAGTGGGTA		
12F	GCTTGGTTTTGAGTCTGA	228	56,7
12R	CAACCTCTCTTCCCAGA		
13F	GCATTGTCTCTGAGTCCA	329	56,7
13R	CCTGTCCTCCTGCTCA		
14F	AACCATTGTCCCTCA	198	53,4
14R	AAACCACCATGACCA		
15F	GCCCAAAGAATGTAGTA	271	53,4
15R	TAAGCAGGCAAGCAATT		

(pb) pares de bases; (F) Forward; (R) Reverse; FONTE: BERTOLA, 2006

Para a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foram utilizados: PCR-buffer 1x (50 mM KCl + 2,5 mM MgCl₂ + 10 mM Ácido Tris-hidroclórico + 0,1% Triton X-100); 0,2 mM dNTPs; 2,25 mM MgCl₂; 5% DMSO; 0,2 uM de cada par de *primers* (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 °C por 5 minutos

(denaturação inicial), 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de hibridização por 30 segundos, 72 °C por 40 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Tabela 8 – Pares de *primers* utilizados para amplificação dos 5 éxons codificantes do gene *KRAS* (éxon 2 ao 6), e seus respectivos produtos (corresponde ao tamanho da região amplificada, em pares de bases)

<i>KRAS</i>	Sequência 5' - 3'	Produto (pb)
2F*	GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA	214
2R*	GAATGGTCCTGCACCAGTAA	
3F*	TCAAGTCCTTTGCCCATTTT	
3R*	TGCATGGCATTAGCAAAGAC	375
4F*	TTGTGGACAGGTTTTGAAAGA	
4R*	AGAAGCAATGCCCTCTCAAG	
5F**	CTCAAGCTCATAATCTCAAACCTCT	380
5R**	GTAGTTCTAAAGTGGTTGCCACC	
6F**	GACAAAACACCTATGCGGATGA	
6R**	GCTAACAGTCTGCATGGAGCA	429

(pb) pares de bases; (F) Forward; (R) Reverse; (*) Schubbert et al., 2006;
(**) Carta et al., 2006. A temperatura de hibridização utilizada foi igual a 61.8°C para todos os éxons.

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).

3.2.2.3. 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.

3.2.2.4. Sequenciamento

Após a purificação, a reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit *Big Dye Terminator Sequencing (Applied Biosystems)*, o qual contém dideoxinucleotídeos 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 °C por 3 minutos (denaturação inicial), 35 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 10 segundos, 60 °C por 4 minutos. Após ciclagem, os produtos foram imediatamente resfriados a 4 °C. 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 μ l 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 °C por 2 minutos. Foram adicionados 2 μ l de uma mistura contendo formamida e *loading buffer* na proporção de 4:1. Por fim, as amostras foram aquecidas a 96 °C 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 homogenizados 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 μ l de persulfato de amônia (APS) a 0,1 mg/ μ l e 17,5 μ l 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*).

3.2.2.5. Confirmação da alteração gênica e estudo de grupo controle

Algumas alterações encontradas e ainda não descritas na literatura foram confirmadas e/ou testadas em um grupo controle. A população de Vitória (Espírito Santo) foi utilizada como grupo controle por ser uma população representativa da população urbana brasileira, como demonstrado em alguns estudos (Danoviz e cols., 2006; Marquezzine e cols., 2008; Pereira e cols., 2003a; Pereira e cols., 2003b).

Foram utilizadas as seguintes técnicas: (1) sequenciamento, (2) clonagem, (3) digestão enzimática, ou (4) *High Resolution Melting*.

3.2.2.5.1. Sequenciamento

Realizado através da reação de PCR, seguida da Purificação e do Sequenciamento conforme descrito em métodos.

3.2.2.5.2. Clonagem

Foi realizada uma PCR e Purificação pelos métodos já descritos. Para clonagem foi utilizado o vetor *pPCR-Script Amp SK(+)* (Stratagene), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Ao final da clonagem os

alelos foram separados e os fragmentos amplificados sequenciados (métodos já descritos).

3.2.2.5.3. Digestão Enzimática

- **Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene *KRAS***

Para cada *SNP* encontrada foram utilizados *primers* degenerados a fim de criar sítios de restrição que diferenciassem as sequências com e sem as alterações encontradas, já que as próprias alterações não criavam estes sítios (Tabela 9). Os produtos da PCR foram incubados com uma unidade de enzima a 37 °C, ON (*over night*). Após este período os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio a 0,5 ng/ml. Após corrida, o gel foi observado em um transluminador com luz ultravioleta (UV). Os fragmentos formados pela digestão encontram-se na Tabela 9.

MÉTODOS

Tabela 9 – *Primers* degenerados criados para genotipagem do grupo controle para polimorfismos no gene *KRAS*, através de PCR seguida por incubação com enzimas de restrição (37 °C, ON)

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	Base Degenerada	Nº de bases	Temp. (°C)	PCR (pb)	Enzima	Digestão (pb): normal alterada
ínt4F*	ATTACATTGTTTCTTTCAG		20				384
ínt4R*	CTAAATATTGTTTATTTCTAGTG	A	25	50.5	384	Fnu4 HI Salt I	327+27
ínt5F**	CAAAACACCTATGCGGATGA		20				208
ínt5R**	TATAGAAGGCATCATCAACACCCTGAAAT	A	30	50.5	208	Psi I	175+32
ex6F*	AACATAAGAAAAGATGAGCAAQA	G	25				160+137+27
ex6R*	ATCTTAGGTATTCAGTTTCTT		21	53.4	324	Nla III	187+137

(F) Forward; (R) Reverse; (*) dCAPS e Primer Select; (**) SNP Detective; (pb) pares de bases; (Temp.) temperatura de hibridização.

- Mutação no gene *BRAF***

A reação de PCR seguiu os mesmos padrões já descritos nos métodos, com temperatura de hibridização de 52 °C e utilizando os *primers*: F 5` GCT TGC TCT GAT AGG AAA ATG AG 3` e R 5` TTT CTA GTA ACT CAG CAG CAT CTC 3`. A reação de digestão utilizou uma unidade da enzima EcoRV, a 37 °C, O.N. Após este período os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio a 0,5 ng/ml. Após corrida, o gel foi observado em um transluminador com luz ultravioleta (UV). O produto amplificado, com 231 pares de bases (pb) na sequência normal, foi fragmentado em 131 pb e 100 pb na sequência mutada.

3.2.2.5.4. *High Resolution Melting*

A reação de *Real Time* PCR com *High Resolution Melting* (HRM), seguiu os padrões de PCR descritos anteriormente, com a adição do fluorocromo *Syto 9* (*Invitrogen*) a 1,5 mM. Foi utilizado o equipamento *Rotor-Gene 6000*, *Corbett Research*.

3.2.2.6. Estudo colaborativo

O sequenciamento do gene *BRAF* foi realizado em apenas um paciente pelo grupo do Dr. Martin Zenker, colaborador do nosso estudo, pertencente ao Instituto de Genética Humana da Universidade da cidade de Erlangen-Nuremberg, na Alemanha.

3.2.3. Análise Estatística

Para análise estatística dos dados deste estudo foram utilizados o teste exato de Fisher (para amostras com até 20 dados) e o teste do qui-quadrado (para amostras maiores de 20 dados). Ambos testam as diferenças entre dois grupos independentes (G1 e G2), em relação a uma

variável qualquer que só admita duas alternativas como resposta. Isso leva à construção de uma tabela de contingência 2 x 2.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os achados clínicos dos propósitos com SN e CFC deste estudo encontram-se na Tabela 10.

Dos três pacientes com síndrome de Costello, todos apresentaram baixa estatura, face típica, cardiopatia (sendo um com MIOCH, um com defeitos septais e o último com anomalia de Ebstein), atraso DNPM e/ou RM, cabelos encaracolados, pregas palmares e plantares evidentes, hiperqueratose folicular, 2/3 com hiperpigmentação, 1/2 meninos apresentou criptorquia e 1/3 com papiloma perinasal.

Dos 11 pacientes com NFSN, todos com face sugestiva da SN, apenas dois apresentaram baixa estatura. Três deles manifestaram cardiopatia (sendo um com EPV, um com MIOCH e um com CIA), 2/4 meninos, criptorquia, seis, atraso DNPM e/ou RM. Os 11 afetados preenchem os critérios para a neurofibromatose tipo I, com manchas CAL, efélides, neurofibromas e/ou glioma do nervo óptico.

Os três pacientes com síndrome de LEOPARD apresentaram face típica, MIOCH, manchas lentiginosas, dois deles com baixa estatura e dois deles com perda auditiva. Nenhum deles apresentou dificuldade escolar.

RESULTADOS

Tabela 10 – Achados clínicos dos propósitos com síndrome de Noonan (SN) e com síndrome cardiofaciocutânea (CFC) deste estudo

Características clínicas	SN = 95		CFC = 13	
	n/ total	(%)	n/ total	(%)
Baixa estatura	73/95	77%	8/13	62%
Face típica	94/95	99%	13/13	100%
hipertelorismo	46/95	48%	8/13	62%
inclinação palpebral	63/95	66%	11/13	85%
proptose	30/95	32%	6/13	46%
ptose	49/95	52%	6/13	46%
Pescoço curto/ alado	79/94	84%	12/13	92%
Deformidade esternal	49/94	52%	4/13	31%
pectus em S	23/49	47%	2/4	50%
Cardiopatia	72/94	77%	6/13	46%
EPV	48/72	67%	3/6	50%
MIOCH	11/72	15%	2/6	33%
Anomalia Renal	13/83	16%	1/13	8%
Criptorquia	28/56	50%	2/2	100%
Cabelos encaracolados	8/95	8%	12/13	92%
Sombrancelhas esparsas	10/95	11%	11/13	85%
Hiperqueratose folicular /palmo-plantar	13/95	14%	9/13	69%
Atraso DNPM e/ou Retardo Mental	52/93	56%	12/13	92%
Nervos corneanos espessados	33/69	48%	1/12	8%
Anomalia hematológica*	36/91	40%	7/12	58%
LMMJ	2/95	2%	0	0%
Anomalia vertebral	34/77	44%	6/12	50%
defeito de curvatura	22/34	65%	4/6	67%
fusão vertebral e/ou diminuição dos espaços intravertebrais	10/34	29%	1/6	17%
Dilatação ventricular no SNC**	1/5	20%	5/11	45%

* As anomalias hematológicas incluem alteração no coagulograma, e/ou número ou função de plaquetas, e/ou diminuição dos fatores de coagulação; ** sistema nervoso central

O estudo cromossômico com banda G do sangue periférico foi normal em todos os probandos.

4.1. Gene *PTPN11*

Dos novos pacientes com SN incluídos neste estudo, 43% (20/46) apresentavam mutação no gene *PTPN11* (Tabela 11). Destes, em quatro casos, considerados familiares pelo fenótipo, a mesma mutação foi identificada em um dos genitores. Dos 16 pacientes esporádicos (com mutação no gene *PTPN11*) ambos os genitores foram genotipados em cinco casos e apenas um genitor em um caso. Nenhuma mutação foi encontrada nestes genitores. Nos 10 casos restantes o genótipo dos pais não foi realizado por falta de disponibilidade ou recusa.

Das mutações encontradas no gene *PTPN11* nos pacientes com síndrome de Noonan, todas do tipo *missense*, as mutações p.E69V e p.Q510P não haviam sido descritas previamente, a última já relatada em casos de síndrome de LEOPARD (Kalidas e cols., 2005; Keren e cols., 2004). Foi possível genotipar apenas os genitores do paciente com a mutação p.Q510P, os quais não apresentaram a mesma alteração. Para a mutação p.E69V foi realizado um estudo no grupo controle (n=96) através da técnica de *HRM*. Em dois indivíduos do grupo controle a curva de denaturação apresentou um padrão distinto tanto do grupo controle quanto da sequência com a mutação p.E69V. Estas duas amostras foram sequenciadas e identificou-se a alteração sinônima p.H85H.

RESULTADOS

O paciente com a mutação p.Q510P apresentou um quadro clínico com baixa estatura, face típica, criptorquia, atraso da fala e uma mancha CAL, sem cardiopatia.

O paciente com a mutação p.E69V apresentou um quadro clínico com baixa estatura, face típica, defeito parcial do septo atrio-ventricular, atraso no DNPM e sintomas sugestivos de uma JMML nos primeiros meses de vida.

Tabela 11 – Mutações encontradas no gene *PTPN11* com sua localização na proteína, nos 71 novos pacientes com as síndromes de Noonan e Noonan-like

<i>PTPN11</i>	Mutação	SN n=20 SNL n=1	Domínio protéico
Éxon 3	p.Y63C	3 (SN)	N-SH2
Éxon 3	p.E69V*	1(SN)	N-SH2
Éxon 7	p.Y279C	1 (SN)	PTP
Éxon 7	p.I282V	1 (SN)	PTP
Éxon 8	p.N308D	11 (SN)	PTP
Éxon 8	p.N308S	2 (SN)	PTP
Éxon 13	p.Q510P	1 (SN)	PTP
Éxon 13	p.E532K*	1 (CFC)	PTP

* ainda não descrita

Um paciente com síndrome CFC apresentou a mutação p.E532K no gene *PTPN11*, mutação ainda não descrita (Tabela 11). Os pais deste paciente foram avaliados e a mesma alteração gênica foi observada na mãe, a qual não apresentava fenótipo sugestivo da síndrome CFC. Este paciente apresentava um atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), dilatação ventricular, dismorfismos faciais, cardiopatia congênita (estenose pulmonar valvar e comunicação interatrial) e anomalias cutâneas caracterizadas por alopecia areata, sobrancelhas esparsas, mancha café-au-lait (CAL) e nevos melanocíticos em pé (Figura 5).

RESULTADOS

Figura 5 – Paciente com síndrome cardiofaciocutânea e mutação p.E532K no gene *PTPN11* apresentando face típica, com sobrancelhas esparsas, alopecia areata e nevos melanocíticos em pé

Como para a síndrome CFC o principal gene responsável é o gene *BRAF* (78%), houve o interesse em estudá-lo neste paciente. O sequenciamento para este gene foi realizado pelo grupo do Dr. Martin Zenker, que identificou a troca c.1802A>T no paciente, responsável pela mutação p.K601I. A mesma alteração não foi encontrada em nenhum dos genitores.

A mutação p.K601I encontrada no gene *BRAF* ainda não foi descrita na literatura e, portanto, foi testada no grupo controle (n=97) por digestão enzimática, o qual não apresentou a mutação.

O resumo das frequências das mutações encontradas no gene *PTPN11* para o total de 125 propósitos deste estudo encontra-se na Tabela 12.

RESULTADOS

Tabela 12 – Resultado do estudo do gene *PTPN11* no total dos 125 probandos com as síndromes de Noonan e Noonan-like

<i>PTPN11</i>	com mutação n (%)	sem mutação n (%)	TOTAL
Sd. Noonan	42 (44)	53 (56)	95
CFC	1	12	13
Costello	0	3	3
NFSN	1	10	11
LEOPARD	3	0	3
TOTAL	47 (38)	78 (62)	125

4.2. Gene *KRAS*

No estudo do gene *KRAS* nos 95 pacientes com SN, apenas um caso apresentou a troca c.436A>G, originando a mutação p.N85S (Figura 6). Este paciente também apresentou a alteração p.N308D no gene *PTPN11*. A mutação no gene *KRAS* foi encontrada em um dos genitores (sem fenótipo sugestivo da SN), diferente da mutação no gene *PTPN11* que ocorreu *de novo*. O paciente apresentava quadro clínico com dismorfismos faciais, baixa estatura, *pectus carinatum/excavatum* e dificuldade escolar, sem cardiopatia (Figura 7).

RESULTADOS

Figura 6 - Cromatograma ilustrando a troca c.436A>G, causando a mutação p.N85S no gene *KRAS* em um paciente com a síndrome de Noonan

Figura 7 – Paciente com síndrome de Noonan e as mutações p.N85S no gene *KRAS* e p.N308D no gene *PTPN11* apresentando face típica, com aparente hipertelorismo, inclinação para baixo das fendas palpebrais, ptose palpebral e dobramento acentuado da porção superior da hélice

Esta mutação ainda não foi relatada na literatura e, portanto, foi testada no grupo controle (n=100) por sequenciamento do éxon envolvido, o qual não apresentava a mutação (Figura 8).

Figura 8 – Curva de denaturação por HRM (*High Resolution Melting*) onde é possível observar diferentes padrões entre a sequência com a mutação p.N85S (em vermelho) no gene *KRAS* e as sequências do grupo controle (em azul). A amostra com a mutação foi feita em duplicata

Outra mutação no gene *KRAS* foi encontrada em um paciente com fenótipo compatível com a síndrome de Costello, dentre os 30 pacientes com SNL estudados. Esta mutação envolvia a troca do nucleotídeo c.194A>G, que provoca a substituição p.K5E (Figura 9).

Figura 9 – Cromatograma ilustrando a troca c.194A>G, causando a mutação p.K5E no gene *KRAS* em um paciente com a síndrome de Costello

As características clínicas deste paciente englobam baixa estatura, um atraso importante do desenvolvimento DNPM, com retardo mental, macrocefalia relativa, dismorfismos faciais, com traços faciais grosseiros, pescoço curto e alado, *pectus excavatum*, cardiopatia congênita

(miocardiopatia hipertrófica com estenose pulmonar valvar), cabelos encaracolados, sobrancelhas esparsas lateralmente, hiperqueratose folicular, pele redundante, pregas palmares e plantares evidentes, hiperpigmentação da pele (Figura 10-A). Na evolução, o paciente desenvolveu linfedema de membros inferiores e papiloma nasal. Esta mutação não estava presente na mãe nem no irmão do paciente. Não foi possível realizar o estudo molecular no pai do paciente, pois este era falecido. O irmão mais novo, com quadro clínico semelhante ao do propósito (Figura 10-B), faleceu aos 4 anos e 7 meses de idade devido a complicações da miocardiopatia hipertrófica (Bertola e cols., 2007).

Figura 10 – Fotografia da paciente com síndrome de Costello e a mutação K5E no gene *KRAS*. Em (A), a paciente adulta, evidenciando-se a presença do papiloma nasal. Em (B) observa-se a paciente ao lado do irmão falecido, onde em ambos é possível observar traços faciais grosseiros e macroglossia

A)

B)

O objetivo deste trabalho foi sequenciar apenas os éxons. Para obtermos bons resultados de sequenciamento, os *primers* foram desenhados em regiões intrônicas, próximas aos éxons (cerca de 20 a 100 bases). Com isso, ao ler as sequências foi possível analisar pequenas partes

RESULTADOS

intrônicas, o que permitiu a identificação de dois *SNPs* intrônicos, além de um exônico: (1) IVS 4, nt +92, em 31% (39/125) dos pacientes (ainda não descrito); (2) IVS 5, nt -9, em 15% (19/125) dos pacientes (rs12313763); (3) EX 6, D173D, em 38% (47/125) dos pacientes (rs1137282).

Para os *SNPs* encontrados, foram testados em 96, 92 e 90 pacientes do grupo controle, para as alterações (1), (2) e (3), respectivamente. Este ensaio foi feito por digestão enzimática.

Os resíduos envolvidos nos três *SNPs* não são conservados entre as espécies (*VISTA*). Entretanto, a alteração do éxon 6 altera a estrutura secundária do RNA mensageiro (*GeneBee*). Não foi possível avaliar o potencial de alteração no sítio de *splicing* (*GeneSplicer*). O sítio de modulação permaneceu inalterado para todas as *SNPs* (*ESEFinder*). A frequência genotípica dos polimorfismos encontrados no gene *KRAS* no grupo de estudo não diferiu da observada no grupo controle (Tabela 13).

Tabela 13 – Comparação da frequência genotípica dos polimorfismos encontrados no gene *KRAS* entre o grupo de estudo (n=125) e o grupo controle

	IVS 4	IVS 5	EX 6
Nucleotídeo	A>G	G>A	T>C
Posição	+92	-9	704
dbSNP	----	rs12313763	rs1137282
População de estudo	AA 69%	CC 85%	TT 63%
	AG 29%	CT 15%	TC 35%
	GG 2%	TT 0%	CC 2%
População brasileira normal (grupo controle)	AA 65%	CC 84%	TT 58%
	AG 35%	CT 16%	TC 35%
	G/G 0%	TT 0%	CC 7%

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

Conforme observado na Tabela 6, os achados clínicos dos propósitos com SN deste estudo estão de acordo com os dados da literatura (Sharland e cols., 1992). As características clínicas mais frequentes foram: face típica (99%), pescoço curto e/ou alado (84%), baixa estatura (77%) e cardiopatia (77%).

O estudo cromossômico foi realizado nos pacientes com SN e SNL pelo fato de que algumas anormalidades cromossômicas, especialmente a síndrome de Turner, apresentam características clínicas que se sobrepõem ao quadro clínico dessas síndromes. Nenhum paciente apresentou alteração nos cromossomos, o que afasta a possibilidade de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais contempladas pelo poder de resolução da técnica.

5.1. Gene *PTPN11*

No estudo do gene *PTPN11*, nos 71 novos pacientes com síndrome de Noonan e síndromes Noonan-like, 21 apresentaram mutação. Destes, 20/46 eram afetados pela SN (43%), frequência semelhante à encontrada na literatura (Tartaglia e cols., 2002).

As mutações encontradas nos casos novos da SN já haviam sido descritas, com exceção das alterações p.E69V e p.Q510P. Esta última já foi descrita na síndrome de LEOPARD (Kalidas e cols., 2005; Keren e cols., 2004). O paciente com a mutação p.Q510P *de novo*, tem 4 anos 9 meses e possui apenas uma mancha CAL, sem manchas lentiginosas e sem cardiopatia. Não preenche, por hora, os critérios clínicos da síndrome de LEOPARD. O seguimento desta criança é importante uma vez que as manchas lentiginosas – principal característica da SL – normalmente aparecem ao redor dos 4 ou 5 anos de idade (Sarkozy e cols., 2008).

A mutação p.E69V não foi identificada no grupo controle e prediz dano à estrutura e/ou função da proteína (Polyphen), sugerindo que a mesma seja responsável pelo fenótipo da síndrome de Noonan.

Já está bem estabelecido que diversas mutações germinativas no gene *PTPN11* predispõem ao desenvolvimento de LMMJ, especialmente a mutação p.T73I. O paciente com SN aqui descrito é o primeiro caso envolvendo a mutação p.E69V e esta síndrome mielodisplásica. Na literatura, esta alteração, quando somática, já foi relacionada ao

desenvolvimento de LMA (Aoki e cols., 2008). O seguimento deste paciente deve, portanto, incluir uma avaliação cuidadosa quanto à ocorrência de anomalias hematológicas futuras.

Embora a correlação genótipo-fenótipo nos pacientes com síndrome de Noonan e mutações no gene *PTPN11* não esteja totalmente estabelecida, algumas características são mais frequentes neste grupo de indivíduos.

A Tabela 14 relaciona o quadro clínico dos pacientes com SN deste estudo, com e sem mutação no gene *PTPN11*. Nota-se que os pacientes com mutação apresentam incidência significativamente maior de baixa estatura em relação aos pacientes sem mutação, como descrito por Zenker e cols. (2004). Outra diferença significativa existe em relação ao tipo de cardiopatia: maior frequência de EPV e menor frequência de MIOCH em pacientes com mutação, já descrito por Tartaglia e cols. (2002).

A Tabela 15 relaciona os pacientes com SN que apresentaram mutação em um dos três principais éxons do gene *PTPN11* (3-8-13) com o tipo de cardiopatia, destacando o aminoácido 308 que é um *hotspot*. Nota-se que indivíduos que apresentam mutação no gene *PTPN11*, independentemente do éxon, apresentam uma maior incidência de EPV, conforme descrito por Tartaglia e cols. (2002). Quanto à comparação com mutações localizadas no aminoácido 308, na nossa casuística, 6/7 casos com a mutação p.N308D e cardiopatia apresentaram EPV, mesmo resultado obtido por Sarkozi e cols. (2003). Neste mesmo trabalho foi observada uma

DISCUSSÃO

maior incidência de defeitos septais nos pacientes com mutação no éxon 3. Na nossa casuística com mutação neste éxon, nenhum paciente apresentou defeito septal.

Tabela 14 - Quadro clínico dos pacientes com síndrome de Noonan deste estudo, com (+) e sem (-) mutação no gene *PTPN11*

	PTPN11 +		PTPN11 -		p
Quadro clínico	n = 42		n = 53		
Baixa estatura	37	88%	36	68%	0,03*
Dismorfismos cranio-faciais					
típico	41	98%	53	100%	0,44
pescoço curto e/ou alado	36/41	88%	43	81%	0,41
Deformidade esternal	22/41	54%	27	51%	0,84
Cardiopatia	33	79%	39/52	75%	0,81
EPV com ou sem outra lesão	27/33	82%	21/39	54%	0,01*
MIOCH	3/33	9%	8/39	21%	0,01*
Criptorquia	12/23	52%	16/33	48%	1
Atraso DNPM e/ou Retardo Mental	24/41	59%	29/52	56%	0,84
Anomalia Hematológica **	19/40	48%	17/50	34%	0,2
Tumores	1	2%	4	8%	0,38
tumor de células gigantes	1	100%	3	75%	1

* p significativa < 0,05; ** As anomalias hematológicas incluem alteração no coagulograma, e/ou número ou função de plaquetas, e/ou diminuição dos fatores de coagulação

Tabela 15 – Distribuição das diferentes cardiopatias encontradas em pacientes com síndrome de Noonan e com mutação em um dos três principais éxons envolvidos do gene *PTPN11*.

	EX 3	EX 8		EX 13
		14/18 *		
Cardiopatia	11/12	p.N308D 7/11	p.N308S 6/6	7/8
EPV com ou sem CIA	10	6	2	6
MIOCH	1	0	1	1
CIA e/ou CIV	0	0	2	0
Outros	0	1	1	0

* Um paciente com a mutação p.F285S apresentou EPV com CIA

Nas síndromes Noonan-like, o gene *PTPN11* é responsável pelas síndromes de LEOPARD (Digilio e cols., 2002) e raros casos de NFSN (Bertola e cols., 2005; Thiel e cols., 2009).

Um único paciente com SNL, com quadro clínico típico de CFC, apresentou a mutação p.E532K no gene *PTPN11*, não descrita previamente. A mesma alteração gênica foi encontrada na mãe, a qual não apresentava quadro clínico sugestivo da síndrome CFC ou da SN. Esta alteração provavelmente não possui qualquer efeito fenotípico (*Polyphen*) e encontra-se em uma região não conservada da proteína (*VISTA*). Além disso, sabe-se que a maioria dos casos de síndrome CFC são esporádicos e que não há descrição de casos típicos desta síndrome com mutação no gene *PTPN11* (Ion e cols., 2002; Kavamura e cols., 2003), o que sugere que esta alteração não seja responsável pelo fenótipo sindrômico.

Por estas razões, para este paciente foi realizado o estudo do gene *BRAF* que identificou a mutação p.K601I, não encontrada em nenhum dos genitores. É uma mutação ainda não descrita, que não estava presente no grupo controle. Além disso, esta alteração prediz dano à estrutura e/ou função da proteína (*Polyphen*). Portanto, neste caso, o fenótipo da síndrome CFC foi associado à mutação no gene *BRAF*, mas não se pode afastar totalmente que a mutação no gene *PTPN11* não exerça um efeito discreto neste fenótipo.

5.2. Gene *KRAS*

Até o momento, o gene *KRAS* já foi estudado em 880 pacientes, sendo 723 com SN. Nesta síndrome, a positividade de mutação no gene *KRAS* foi de 2,2%, variando entre 0% e 5,7% (Carta e cols., 2006; Ferrero e cols., 2008; Ko e cols., 2008; Lee e cols., 2007; Lo e cols., 2008b; Nava e cols., 2007; Nystrom e cols., 2008; Schubbert e cols., 2006; Zenker e cols., 2007).

Na nossa casuística de síndrome de Noonan sem mutação no gene *PTPN11* (n=54), nenhum deles apresentou mutação no gene *KRAS*. Neste trabalho, como nos estudos da literatura, observamos que o gene *KRAS* tem pouca expressão na etiologia da síndrome de Noonan.

Levando em consideração a frequência média de 2,2% encontrada na literatura, era esperado que um ou dois paciente(s) apresentasse(m) mutação no gene *KRAS*, um número muito próximo de zero, em decorrência do número da nossa casuística ser pequeno, com um poder estatístico baixo.

Ainda assim, na tentativa de justificar a ausência do encontro de mutação nos pacientes da nossa casuística, as principais características clínicas da SN foram comparadas entre pacientes deste estudo – sem mutação nos genes *PTPN11* e *KRAS* – e pacientes descritos na literatura – com mutação no gene *KRAS* (Tabela 16). A frequência de atraso no DNPM

DISCUSSÃO

e/ou de retardo mental foi menor na nossa casuística, única diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$). Este fato pode justificar a discrepância da taxa de mutação observada entre o presente trabalho e os dados da literatura, uma vez que alguns estudos mostram que pacientes com mutação no gene *KRAS* apresentam maior incidência e grau de retardo mental e atraso no DNPM (Zenker e cols., 2007).

Tabela 16 – Comparação entre pacientes com síndrome de Noonan sem mutação no gene *PTPN11* deste estudo e pacientes com síndrome de Noonan descritos na literatura sem mutação no gene *PTPN11* e com mutação no gene *KRAS* (Bertola e cols., 2007; Carta e cols., 2006; Ko e cols., 2008; Lo e cols., 2008b; Nava e cols., 2007; Niihori e cols., 2006; Schubbert e cols., 2006; Sovik e cols., 2007; Zenker e cols., 2007)

Quadro clínico	Literatura n=22		Presente estudo n=53		p
Baixa estatura	15	68%	36	68%	1
Dismorfismos cranio-faciais					
típico	22	100%	53	100%	1
pescoço curto e/ou alado	13	59%	43	81%	0.08
Deformidade esternal/ pectus	12	55%	27	51%	0.81
Cardiopatias	16	73%	39/52	75%	1
EPV com ou sem outra lesão	7	44%	21	54%	0.61
MIOCH	2	13%	8	21%	0.71
Criptorquia	8/14	57%	16/33	48%	0.75
Atraso DNPM e/ou Retardo Mental	15/16	94%	34/53	64%	0.03*
Tumores	1	5%	4	8%	1
tumor de células gigantes	0	0%	3	74%	0.4

* p significativa < 0,05

No presente estudo, o gene *KRAS* também foi estudado em pacientes com mutação no gene *PTPN11*, na tentativa de estabelecer se alterações em mais de um gene da via RAS/MAPK seria capaz de influenciar a variabilidade fenotípica entre pacientes de uma mesma síndrome.

Em um paciente com SN e com a mutação p.N308D no gene *PTPN11*, a mutação p.N85S no gene *KRAS* também foi identificada. Apesar deste paciente apresentar estas duas alterações, possui um quadro clínico

leve da SN, com face típica, baixa estatura e deformidade esternal, sem maiores complicações. Entretanto, o paciente apresenta um quadro importante de dificuldade escolar, o que não é comum em pacientes com a mutação p.N308D (Tartaglia e cols., 2002).

Embora a mutação p.N85S no gene *KRAS* não tenha sido identificada no grupo controle, provavelmente não possui qualquer efeito fenotípico (Polyphen). Além disso, também foi encontrada em um dos genitores sem o fenótipo da SN, sugerindo que a mesma seja somente uma variante rara. É bem provável que o fenótipo sindrômico deste paciente esteja associado apenas à mutação p.N308D no gene *PTPN11* (a mais frequente alteração gênica descrita na síndrome de Noonan), mas não há como afastar totalmente que a alteração gênica no gene *KRAS* não esteja exercendo um papel muito discreto neste fenótipo.

Quanto aos pacientes com síndrome de Noonan-like descritos na literatura, o gene *KRAS* foi considerado responsável pelas síndromes CFC e Costello (Nava e cols., 2007; Niihori e cols., 2006; Zenker e cols., 2007).

Na literatura, mutações no gene *KRAS* em pacientes com CFC foram encontradas em 6,5%, variando entre 2,5% e 9,5% (Carta e cols., 2006; Nava e cols., 2007; Niihori e cols., 2006; Schubbert e cols., 2006; Sovik e cols., 2007; Zenker e cols., 2007).

Nenhum dos nossos 13 pacientes com CFC apresentou mutação no gene *KRAS*. Na literatura, os pacientes com síndrome CFC e com mutação

no gene *KRAS* geralmente não apresentam anomalias ectodérmicas como hiperqueratose e lesões ictiosiformes (Niihori e cols., 2006; Zenker e cols., 2007). Na nossa casuística, 69% (9/13) apresentava tais características que, na literatura, estão mais relacionadas a mutações no gene *BRAF* (o principal responsável pela doença) (Niihori e cols., 2006).

Na nossa casuística, um entre três pacientes com síndrome de Costello apresentou a mutação p.K5E no gene *KRAS*, a qual não havia sido descrita previamente. Esta alteração gênica foi considerada patogênica, pois não estava presente na mãe (sem o fenótipo da síndrome), não foi identificada no grupo controle, o aminoácido envolvido é conservado entre diferentes espécies (*VISTA*) e prediz dano à estrutura e/ou função da proteína (Polyphen).

O diagnóstico inicial deste paciente era de síndrome de Noonan, entretanto, a presença de um atraso importante no DNPM, com retardo mental, associado à macrocefalia relativa, traços faciais grosseiros, pele redundante, pregas palmares e plantares evidentes, hiperpigmentação da pele e, especialmente, o papiloma nasal, levaram a alteração diagnóstica para síndrome de Costello.

Logo após a publicação deste caso pelo nosso grupo (Bertola e cols., 2007), outro trabalho descreveu a mesma alteração, também em paciente com síndrome de Costello (Nava e cols., 2007). O quadro clínico deste paciente continha: baixa estatura, cardiopatia e atraso no DNPM.

No trabalho de Zenker e cols. (2007), dois de três pacientes com síndrome de Costello sem mutação no gene *HRAS* - gene mutado em 90% dos casos de SC (Aoki e cols., 2005; Kerr e cols., 2006) - apresentavam mutação no gene *KRAS*; uma delas envolvendo o mesmo aminoácido encontrado no nosso trabalho (p.K5N). Esta mutação, como um evento somático, já foi descrita em neoplasia de estômago, diferente da mutação encontrada em nosso paciente (p.K5E), que nunca foi descrita como um evento somático em câncer (COSMIC).

O fato de vários genes da via RAS/MAPK ser sabidamente oncogênicos quando presentes como mutações somáticas, alerta para a possibilidade dos indivíduos afetados pela síndrome de Noonan e Noonan-like apresentarem um risco aumentado de desenvolverem uma neoplasia. A síndrome de Costello é a doença que apresenta um risco maior para câncer (ao redor de 20%) e, uma vez que 90% dos casos são decorrentes de mutação no gene *HRAS*, este gene, em especial, foi relacionado ao desenvolvimento de neoplasias.

Entretanto, o risco de desenvolvimento de câncer associado a mutações germinativas no gene *KRAS* ainda não está estabelecido. Um único paciente com síndrome de Noonan e mutação nesse gene evoluiu com LMMJ (Schubbert e cols., 2006). O fato de haver pouco relato de pacientes com mutação no gene *KRAS* dificulta o estabelecimento da verdadeira relação com o desenvolvimento de neoplasias. A descrição de novos casos

com mutações germinativas neste gene, assim como um acompanhamento cuidadoso destes indivíduos permitirá esclarecer esta relação.

As doenças de herança autossômica dominante, em geral, apresentam uma variabilidade clínica acentuada. Genes modificadores, polimorfismos e fatores ambientais são frequentemente responsabilizados por esta variabilidade, embora esta afirmação raramente seja comprovada.

Mutações em mais de um gene foram encontradas em dois pacientes: o primeiro com SN e as mutações p.N308D no gene *PTPN11* e p.N85S no gene *KRAS* e o segundo com CFC e as mutações p.E532K no gene *PTPN11* e p.K601I no gene *BRAF*. As alterações p.N308D e p.K601I foram consideradas suficientes, por si só, para determinar a manifestação clínica da síndrome. Já as outras duas alterações estavam presentes em um genitor não afetado, o que sugere que não tenham influência sobre o fenótipo. Entretanto, não é possível afastar totalmente que estas alterações apresentem um efeito sutil e que em conjunto com outras variações genéticas e/ou ambientais tenham um efeito modulador.

Os *SNPs* são alterações genéticas que apresentam uma frequência maior ou igual a 1% na população. O efeito modulador de alguns *SNPs* já foram comprovados para algumas doenças como, por exemplo, a fibrose cística (Elce e cols., 2009; Levy e cols., 2009).

Neste estudo, os *SNPs* encontrados no gene *KRAS* (um exônico e dois intrônicos) apresentaram uma frequência semelhante tanto no grupo de estudo com SN como no grupo controle. Ainda assim, a frequência dos

SNPs foi comparada quanto à presença ou não de cardiopatia e de baixa estatura, características comuns nos pacientes com SN e com mutação no gene *PTPN11*. A mutação p.N308D foi avaliada isoladamente, por ser a mutação mais frequente. Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as características clínicas e os *SNPs* analisados (Tabela 17). Da mesma forma que as alterações gênicas consideradas não patogênicas citadas acima possam ter algum efeito aditivo, não se pode descartar que os *SNPs* também apresentem tal efeito.

Tabela 17 – Relação dos polimorfismos encontrados no gene *KRAS* em pacientes com síndrome de Noonan e com mutação no gene *PTPN11*, quanto: A) presença (+) ou ausência (-) de baixa estatura; B) (+) ou (-) de cardiopatia; C) p.N308D no gene *PTPN11* e (+) ou (-) de baixa estatura; D) p.N308D no gene *PTPN11* e (+) ou (-) de cardiopatia

		Frequência (%): (+) e (-)	Qui-quadrado	p
A)	IVS4	17,6 e 0	2.08	0.15
	IVS5	6,8 e 0	0.72	0.40
	EX6	77 e 70	0.24	0.62
B)	IVS4	16,7 e 11,1	0.33	0.56
	IVS5	7,6 e 0	1.45	0.23
	EX6	24,2 e 22,2	0.03	0.86
C)	IVS4	----	----	----
	IVS5	----	----	----
	EX6	27,8 e 25	0.01	0.91
D)	IVS4	----	----	----
	IVS5	----	----	----
	EX6	28,6 e 25	0.03	0.86

Embora um grande avanço no conhecimento fisiopatológico da síndrome de Noonan e das síndromes Noonan-like tenha sido obtido nos últimos anos, muitas questões ainda permanecem sem resposta. O estudo

molecular das diferentes síndromes ainda não responde pela totalidade dos casos e a correlação genótipo-fenótipo não está estabelecida de forma clara. Há ainda, portanto, um caminho a ser trilhado para um melhor entendimento das síndromes e, conseqüentemente, um manejo mais adequado, especialmente em relação às cardiopatias congênitas, o maior agravante da síndrome e, talvez, o estabelecimento mais preciso do risco para o desenvolvimento de neoplasias.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O gene *PTPN11* é responsável por aproximadamente 40% dos casos de SN.

O gene *KRAS* tem pouca expressão na etiologia desta síndrome.

Pacientes com SN e mutações no gene *PTPN11* apresentaram uma maior incidência de baixa estatura e de EPV e menor incidência de MIOCH.

A nova mutação encontrada no gene *PTPN11*, p.E69V, amplia o grupo de alterações gênicas nos pacientes com SN e LMMJ.

O gene *KRAS*, até então relacionado às síndromes de Noonan e CFC, mostrou-se responsável por alguns casos de síndrome de Costello.

Tanto as alterações gênicas consideradas não patogênicas como os *SNPs* encontrados no gene *KRAS* parecem não ter uma grande influência sobre a variabilidade fenotípica na SN. Contudo, não é possível afastar totalmente que estas alterações apresentem um efeito sutil e que em conjunto com outras variações genéticas e/ou ambientais tenham um efeito modulador.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Ahmed ML, Foot AB, Edge JA, Lamkin VA, Savage MO, Dunger DB. *Noonan's syndrome: abnormalities of the growth hormone/IGF-I axis and the response to treatment with human biosynthetic growth hormone. Acta Paediatr Scand.* 1991;80,446-50.

Al-Rahawan MM, Chute DJ, Sol-Church K, Gripp KW, Stabley DL, McDaniel NL, Wilson WG, Waldron PE. *Hepatoblastoma and heart transplantation in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome. Am J Med Genet A.* 2007;143A,1481-8.

Allanson JE. *Noonan syndrome. J Med Genet.* 1987;24,9-13.

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;29,992-1006.

Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, Filocamo M, Kato K, Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y. *Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. Nat Genet.* 2005;37,1038-40.

Bertola DR. *Estudo do gene PTPN11 nos pacientes afetados pela síndrome de Noonan.* In *Pediatria* (São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo); 2006.

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;130,378-83.

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;10,186-91.

- 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;52,521-6.
- Bertola DR, Pereira AC, Passetti F, de Oliveira PS, Messiaen L, Gelb BD, Kim CA, Krieger JE. *Neurofibromatosis-Noonan syndrome: molecular evidence of the concurrence of both disorders in a patient. Am J Med Genet A.* 2005;136,242-5.
- Binder G, Neuer K, Ranke MB, Wittekindt NE. *PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome. J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90,5377-81.
- 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;32,1241-8.
- Bos JL. *ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res.* 1989;49,4682-9.
- Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A, Digilio C, Palleschi A, Pizzuti A, Grammatico P, Zampino G, Dallapiccola B, Gelb BD, Tartaglia M. *Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. Am J Hum Genet.* 2006;79,129-35.
- Chen Y, Takita J, Hiwatari M, Igarashi T, Hanada R, Kikuchi A, Hongo T, Taki T, Ogasawara M, Shimada A, Hayashi Y. *Mutations of the PTPN11 and RAS genes in rhabdomyosarcoma and pediatric hematological malignancies. Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45,583-91.
- 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.
- Conti E, Dottorini T, Sarkozy A, Tiller GE, Esposito G, Pizzuti A, Dallapiccola B. *A novel PTPN11 mutation in LEOPARD syndrome. Hum Mutat.* 2003;21,654.
- Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Disponível em: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>. Data de acesso: Dezembro, 2008.

- Costello JM. *A new syndrome: mental subnormality and nasal papillomata. Aust Paediatr J.* 1977;13,114-8.
- Costello JM. *Costello syndrome: update on the original cases and commentary. Am J Med Genet.* 1996;62,199-201.
- Cotterill AM, McKenna WJ, Brady AF, Sharland M, Elsayi M, Yamada M, Camacho-Hubner C, Kelnar CJ, Dunger DB, Patton MA, Savage MO. *The short-term effects of growth hormone therapy on height velocity and cardiac ventricular wall thickness in children with Noonan's syndrome. J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81,2291-7.
- Danoviz ME, Pereira AC, Mill JG, Krieger JE. *Hypertension, obesity and GNB 3 gene variants. Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33,248-52.
- De Luca A, Bottillo I, Sarkozy A, Carta C, Neri C, Bellacchio E, Schirizzi A, Conti E, Zampino G, Battaglia A, Majore S, Rinaldi MM, Carella M, Marino B, Pizzuti A, Digilio MC, Tartaglia M, Dallapiccola B. *NF1 gene mutations represent the major molecular event underlying neurofibromatosis-Noonan syndrome. Am J Hum Genet.* 2005;77,1092-101.
- de Majo SF, de Otero BC, Reichmann A. *[Noonan syndrome: differential diagnosis with Turner's syndrome]. Bol Med Hosp Infant Mex.* 1979;36,1089-97.
- Digilio MC, Sarkozy A, Pacileo G, Limongelli G, Marino B, Dallapiccola B. *PTPN11 gene mutations: linking the Gln510Glu mutation to the "LEOPARD syndrome phenotype". Eur J Pediatr.* 2006a;165,803-5.
- Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, Marino B, Pizzuti A, Dallapiccola B. *Grouping of multiple-lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. Am J Hum Genet.* 2002;71,389-94.
- Digilio MC, Sarkozy A, de Zorzi A, Pacileo G, Limongelli G, Mingarelli R, Calabro R, Marino B, Dallapiccola B. *LEOPARD syndrome: clinical diagnosis in the first year of life. Am J Med Genet A.* 2006b;140,740-6.
- Digilio MC, Pacileo G, Sarkozy A, Limongelli G, Conti E, Cerrato F, Marino B, Pizzuti A, Calabro R, Dallapiccola B. *Familial aggregation of genetically heterogeneous hypertrophic cardiomyopathy: a boy with LEOPARD syndrome due to PTPN11 mutation and his nonsyndromic father lacking PTPN11 mutations. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004;70,95-8.

Du-Thanh A, Cave H, Bessis D, Puso C, Guilhou JJ, Dereure O. *A novel PTPN11 gene mutation in a patient with LEOPARD Syndrome. Arch Dermatol.* 2007;143,1210-1.

Elce A, Boccia A, Cardillo G, Giordano S, Tomaiuolo R, Paoletta G, Castaldo G. *Three novel CFTR polymorphic repeats improve segregation analysis for cystic fibrosis. Clin Chem.* 2009;55,1372-9.

ESE Finder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. Disponível em: <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>. Data de acesso: Dezembro, 2008.

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;90,5156-60.

Ferrero GB, Baldassarre G, Delmonaco AG, Biamino E, Banaudi E, Carta C, Rossi C, Silengo MC. *Clinical and molecular characterization of 40 patients with Noonan syndrome. Eur J Med Genet.* 2008;51,566-72.

Froster UG, Glander HJ, Heinritz W. *[Molecular genetic mutation analysis of the PTPN11 gene in the multiple lentigines (LEOPARD) syndrome]. Hautarzt.* 2003;54,1190-2.

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

GeneBee - Molecular Biology Server: RNA secondary structure prediction. Disponível em: http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html. Data de acesso: Dezembro, 2008.

GeneSplicer : A computational method for splice site prediction Disponível em: http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml. Data de acesso: Dezembro, 2008.

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

Hung CS, Lin JL, Lee YJ, Lin SP, Chao MC, Lo FS. *Mutational analysis of PTPN11 gene in Taiwanese children with Noonan syndrome. J Formos Med Assoc.* 2007;106,169-72.

- Ion A, Tartaglia M, Song X, Kalidas K, van der Burgt I, Shaw AC, Ming JE, Zampino G, Zackai EH, Dean JC, Somer M, Parenti G, Crosby AH, Patton MA, Gelb BD, Jeffery S. *Absence of PTPN11 mutations in 28 cases of cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome. Hum Genet.* 2002;111,421-7.
- Kalidas K, Shaw AC, Crosby AH, Newbury-Ecob R, Greenhalgh L, Temple IK, Law C, Patel A, Patton MA, Jeffery S. *Genetic heterogeneity in LEOPARD syndrome: two families with no mutations in PTPN11. J Hum Genet.* 2005;50,21-5.
- 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;116,359-66.
- Kavamura MI, Pomponi MG, Zollino M, Lecce R, Murdolo M, Brunoni D, Alchorne MM, Opitz JM, Neri G. *PTPN11 mutations are not responsible for the Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome. Eur J Hum Genet.* 2003;11,64-8.
- Keren B, Hadchouel A, Saba S, Sznajer Y, Bonneau D, Leheup B, Boute O, Gaillard D, Lacombe D, Layet V, Marlin S, Mortier G, Toutain A, Beylot C, Baumann C, Verloes A, Cave H. *PTPN11 mutations in patients with LEOPARD syndrome: a French multicentric experience. J Med Genet.* 2004;41,e117.
- Kerr B, Delrue MA, Sigaudy S, Perveen R, Marche M, Burgelin I, Stef M, Tang B, Eden OB, O'Sullivan J, De Sandre-Giovannoli A, Reardon W, Brewer C, Bennett C, Quarell O, M'Cann E, Donnai D, Stewart F, Hennekam R, Cave H, Verloes A, Philip N, Lacombe D, Levy N, Arveiler B, Black G. *Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases. J Med Genet.* 2006;43,401-5.
- 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;53,999-1006.
- Kobylnski O. *Ueber eine flughautähnliche Ausbreitung am Halse. Arch Anthropol.* 1883;14,343-8.
- Kosaki K, Suzuki T, Muroya K, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, Kosaki R, Nagai T, Hasegawa Y, Ogata T. *PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87,3529-33.

- Kratz CP, Niemeyer CM, Castleberry RP, Cetin M, Bergstrasser E, Emanuel PD, Hasle H, Kardos G, Klein C, Kojima S, Stary J, Trebo M, Zecca M, Gelb BD, Tartaglia M, Loh ML. *The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/myeloproliferative disease. Blood.* 2005;106,2183-5.
- Laux D, Kratz C, Sauerbrey A. *Common acute lymphoblastic leukemia in a girl with genetically confirmed LEOPARD syndrome. J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30,602-4.
- Lee ST, Ki CS, Lee HJ. *Mutation analysis of the genes involved in the Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in Korean patients with Noonan syndrome. Clin Genet.* 2007;72,150-5.
- Legius E, Schrandt-Stumpel C, Schollen E, Pulles-Heintzberger C, Gewillig M, Fryns JP. *PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. J Med Genet.* 2002;39,571-4.
- Lehmann LH, Schaeufele T, Buss SJ, Balanova M, Hartschuh W, Ehlermann P, Katus HA. *IMAGE CARDIO MED. A patient with LEOPARD syndrome and PTPN11 mutation. Circulation.* 2009;119,1328-9.
- Levy H, Murphy A, Zou F, Gerard C, Klanderman B, Schuermann B, Lazarus R, Garcia KC, Celedon JC, Drumm M, Dahmer M, Quasney M, Schneck K, Reske M, Knowles MR, Pier GB, Lange C, Weiss ST. *IL1B polymorphisms modulate cystic fibrosis lung disease. Pediatr Pulmonol.* 2009;44,580-93.
- Lo FS, Kuo TT, Wang CJ, Kuo MT, Kuo MC. *Hodgkin's lymphoma in a patient with Noonan syndrome with germ-line PTPN11 mutations. Int J Hematol.* 2008a;88,287-90.
- Lo FS, Lin JL, Kuo MT, Chiu PC, Shu SG, Chao MC, Lee YJ, Lin SP. *Noonan syndrome caused by germline KRAS mutation in Taiwan: report of two patients and a review of the literature. Eur J Pediatr.* 2008b.
- Loh ML, Vattikuti S, Schubert S, Reynolds MG, Carlson E, Lieuw KH, Cheng JW, Lee CM, Stokoe D, Bonifas JM, Curtiss NP, Gotlib J, Meshinchi S, Le Beau MM, Emanuel PD, Shannon KM. *Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. Blood.* 2004;103,2325-31.
- Maheshwari M, Belmont J, Fernbach S, Ho T, Molinari L, Yakub I, Yu F, Combes A, Towbin J, Craigen WJ, Gibbs R. *PTPN11 mutations in Noonan*

syndrome type I: detection of recurrent mutations in exons 3 and 13. Hum Mutat. 2002;20,298-304.

Makita Y, Narumi Y, Yoshida M, Niihori T, Kure S, Fujieda K, Matsubara Y, Aoki Y. *Leukemia in Cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: a patient with a germline mutation in BRAF proto-oncogene. J Pediatr Hematol Oncol.* 2007;29,287-90.

Marquezine GF, Oliveira CM, Pereira AC, Krieger JE, Mill JG. *Metabolic syndrome determinants in an urban population from Brazil: social class and gender-specific interaction. Int J Cardiol.* 2008;129,259-65.

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

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

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

Mutesa L, Pierquin G, Janin N, Segers K, Thomee C, Provenzi M, Bours V. *Germline PTPN11 missense mutation in a case of Noonan syndrome associated with mediastinal and retroperitoneal neuroblastic tumors. Cancer Genet Cytogenet.* 2008;182,40-2.

Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Arveiler B, Lacombe D, Pasmant E, Parfait B, Baumann C, Heron D, Sigaudy S, Toutain A, Rio M, Goldenberg A, Leheup B, Verloes A, Cave H. *Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. J Med Genet.* 2007;44,763-71.

NCBI db SNP at the National Center for Biotechnology Information in Bethesda, Maryland. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. Data de acesso: Maio, 2007

REFERÊNCIAS

NCBI refseq at the National Center for Biotechnology Information in Bethesda, Maryland. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>. Data de acesso: Maio, 2007

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

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

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

Nystrom AM, Ekvall S, Berglund E, Bjorkqvist M, Braathen G, Duchon K, Enell H, Holmberg E, Holmlund U, Olsson-Engman M, Anneren G, Bondeson ML. *Noonan and cardio-facio-cutaneous syndromes: two clinically and genetically overlapping disorders. J Med Genet.* 2008;45,500-6.

Opitz JM, Weaver DD. *The neurofibromatosis-Noonan syndrome. Am J Med Genet.* 1985;21,477-90.

Osawa R, Akiyama M, Yamanaka Y, Ujiie H, Nemoto-Hasebe I, Takeda A, Yanagi T, Shimizu H. *A novel PTPN11 missense mutation in a patient with LEOPARD syndrome. Br J Dermatol.* 2009.

Paradisi M, Pedicelli C, Ciasulli A, Pinto F, Conti E, Sarkozy A, Angelo C. *[PTPN11 gene mutation in LEOPARD syndrome]. Minerva Pediatr.* 2005;57,189-93.

Pereira AC, Mota GF, Cunha RS, Herbenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. *Angiotensinogen 235T allele "dosage" is associated with blood pressure phenotypes. Hypertension.* 2003a;41,25-30.

Pereira AC, Floriano MS, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. *Beta2 adrenoceptor functional gene variants, obesity, and blood pressure level interactions in the general population. Hypertension.* 2003b;42,685-92.

Plowman S, Williamson D, O'Sullivan M, Doig J, Ritchie A, Harrison D, Melton D, Arends M, Hooper M, Patek C. *While K-ras is essential for mouse development, expression of the K-ras 4A splice variant is dispensable*. *Mol Cell Biol*. 2003;23,9245-50.

Polyphen (polymorfism phenotyping) at European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg, Germany. Disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>. Data de acesso: Dezembro, 2008.

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

Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, Lyon E, Ward BE. *ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007*. *Genet Med*. 2008;10,294-300.

Rodriguez-Viciano P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, McCormick F, Rauen KA. *Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome*. *Science*. 2006;311,1287-90.

Roti G, La Starza R, Ballanti S, Crescenzi B, Romoli S, Foa R, Tartaglia M, Aversa F, Fabrizio Martelli M, Mecucci C. *Acute lymphoblastic leukaemia in Noonan syndrome*. *Br J Haematol*. 2006;133,448-50.

Sarkozy A, Digilio MC, Dallapiccola B. *Leopard syndrome*. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3,13.

Sarkozy A, Obregon MG, Conti E, Esposito G, Mingarelli R, Pizzuti A, Dallapiccola B. *A novel PTPN11 gene mutation bridges Noonan syndrome, multiple lentigines/LEOPARD syndrome and Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome*. *Eur J Hum Genet*. 2004a;12,1069-72.

Sarkozy A, Conti E, Digilio MC, Marino B, Morini E, Pacileo G, Wilson M, Calabro R, Pizzuti A, Dallapiccola B. *Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentigines LEOPARD syndrome*. *J Med Genet*. 2004b;41,e68.

Sarkozy A, Conti E, Seripa D, Digilio MC, Grifone N, Tandoi C, Fazio VM, Di Ciommo V, Marino B, Pizzuti A, Dallapiccola B. *Correlation between PTPN11*

gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. J Med Genet. 2003;40,704-8.

Schollen E, Matthijs G, Gewillig M, Fryns JP, Legius E. *PTPN11 mutation in a large family with Noonan syndrome and dizygous twinning. Eur J Hum Genet.* 2003;11,85-8.

Schrader KA, Nelson TN, De Luca A, Huntsman DG, McGillivray BC. *Multiple granular cell tumors are an associated feature of LEOPARD syndrome caused by mutation in PTPN11. Clin Genet.* 2009;75,185-9.

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

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

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;157,1297-9.

Sharland M, Burch M, McKenna WM, Paton MA. *A clinical study of Noonan syndrome. Arch Dis Child.* 1992;67,178-83.

Siwik ES, Zahka KG, Wiesner GL, Limwongse C. *Cardiac disease in Costello syndrome. Pediatrics.* 1998;101,706-9.

Sovik O, Schubbert S, Houge G, Steine SJ, Norgard G, Engelsen B, Njolstad PR, Shannon K, Molven A. *De novo HRAS and KRAS mutations in two siblings with short stature and neuro-cardio-facio-cutaneous features. J Med Genet.* 2007;44,e84.

Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, Hahlen K, Hasle H, Licht JD, Gelb BD. *Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. Nat Genet.* 2003;34,148-50.

Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, van der Burgt I, Crosby AH, Ion A, Jeffery S, Kalidas K, Patton MA, Kucherlapati

RS, Gelb BD. *Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. Nat Genet.* 2001;29,465-8.

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

Thiel C, Wilken M, Zenker M, Sticht H, Fahsold R, Gusek-Schneider GC, Rauch A. *Independent NF1 and PTPN11 mutations in a family with neurofibromatosis-Noonan syndrome. Am J Med Genet A.* 2009;149A,1263-7.

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

Ucar C, Calyskan U, Martini S, Heinritz W. *Acute myelomonocytic leukemia in a boy with LEOPARD syndrome (PTPN11 gene mutation positive). J Pediatr Hematol Oncol.* 2006;28,123-5.

van der Burgt I, Berends E, Lommen E, van Beersum S, Hamel B, Mariman E. *Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome. Am J Med Genet.* 1994;53,187-91.

VISTA Genome Browser: computational tools for comparative genomics. Disponível em: <http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>. Data de acesso: Dezembro, 2008.

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

Yoshida R, Hasegawa T, Hasegawa Y, Nagai T, Kinoshita E, Tanaka Y, Kanegane H, Ohyama K, Onishi T, Hanew K, Okuyama T, Horikawa R, Tanaka T, Ogata T. *Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11 mutation analysis and clinical assessment in 45 patients with Noonan syndrome. J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89,3359-64.

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

REFERÊNCIAS

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