

# Estudio molecular de las formas familiares del síndrome de Noonan.

José Luis Santomé Collazo<sup>1</sup>, Atilano Carcavilla Urquí<sup>2</sup>, Rafael Muñoz Pacheco<sup>3</sup>, Begoña Ezquieta Zubizaray<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Diagnóstico Molecular. Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón. Madrid, Madrid

<sup>2</sup>Unidad de Endocrinología Pediátrica. Hospital Virgen de la Salud. Toledo, Toledo

<sup>3</sup>Laboratorio de Diagnóstico Molecular. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid, Madrid

<sup>4</sup>Laboratorio de Diagnóstico Molecular. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid, Madrid

## Resumen

**Antecedentes:** El síndrome de Noonan ocurre por alteraciones en la vía RAS/MAPK, de las que un 50% son variantes hipermórficas del gen PTPN11. La proporción de formas familiares descrita es muy diversa (30–75%), en parte debido a que la sospecha diagnóstica está limitada por una expresividad clínica variable. **Objetivo:** Determinar, en los estudios familiares realizados, la tasa de mutaciones esporádicas/recurrentes, obtener información sobre su expresividad y presentar casos ilustrativos para el estudio de esta patología. **Métodos:** Estudio retrospectivo sobre 76 familias. Registro de información clínica y genotípica. Secuenciación bidireccional de los exones recurrentes de los genes PTPN11, SOS1, RAF1 y BRAF. **Resultados:** Un 26,31% (20/76) de los estudios solicitados fueron negativos. Se detectaron 37 mutaciones *de novo* (66,66%), 15 formas familiares (25,92%), y 4 casos positivos indeterminados. El rango de fenotipos observados varía desde formas letales perinatales con sospecha prenatal, hasta fenotipos adultos atenuados/crípticos. En 11/18 de los casos familiares no se informó de fenotipo en el pariente afecto. **Conclusiones:** El porcentaje de formas familiares en nuestra población es similar al documentado previamente y las mutaciones asociadas a éstas afectan con menor frecuencia al dominio N-SH2. La expresividad clínica de las alteraciones en PTPN11

es muy variable, según los estudios comparativos intra/inter-familiares.

**Palabras clave:** Síndrome de Noonan, Consejo genético, Diagnóstico genético, Pleiotropía genética, Discapacidades del desarrollo.

## Abstract

*Background: Noonan Syndrome is due to mutations in the Ras/MAPK pathway genes, being PTPN11 the most prevalent gene (almost 50% of cases). The reported frequency of familial forms varies in a wide range (30-75%), and this is in part due to the clinical variable expressivity which negatively affects the diagnostic accuracy.*

*Objectives: To determine in the familial molecular studies performed the rate of sporadic/recurrent mutations, to obtain information about their expressivity and to show some relevant cases helpful when dealing with this pathology.*

*Methods: Retrospective study in 76 families. Clinical and genotypic information has been explored. Bidirectional sequencing of recurrent exons in the PTPN11, SOS1, RAF1 and BRAF genes.*

*Results: 26,31% (20/76) of requested studies were negative. We detected 37 *de novo* mutations (66,66%), 15 familial forms (25,92%) y 4 non-determined cases. Clinical phenotypes range from perinatal life-threatening with prenatal suspicion to adult/mild/cryptic phenotypes. Clinical description was absent in 11/18 of relatives.*

*Conclusions: The rate of familial forms in our population is similar to that previously reported. The N-SH2 domain was less frequently affected in the-*

## Correspondencia:

José Luis Santomé Collazo

Laboratorio de Diagnóstico Molecular

Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón

Ronda de Monte Alto, 36, BC2-C, 15002, Madrid, Madrid

E-mail: jluis.santome@gmail.com

E-mail: santomecjl@gmail.com

se cases. *Clinical expressivity of PTPN11 defects shows a broad spectrum as deduced from comparative intra/inter-familial studies.*

**Key Words:** Noonan syndrome, Genetic counseling, Molecular Diagnostic Testing, Genetic Pleiotropy, Developmental Delay Disorders.

## INTRODUCCIÓN:

Resulta paradójico que el descubrimiento de la base genética del síndrome de Noonan (SN; MIM #163950) haya sido un logro de tan reciente adquisición cuando se trata de una enfermedad con una historia tan dilatada. Los primeros casos fueron descritos ya en el siglo XIX<sup>(1)</sup> y principios del XX<sup>(2)</sup>, pero no fue hasta la aparición de los trabajos de Noonan y Ehmke en la década de los 60<sup>(3)</sup>, cuando se elevó este fenotipo a la categoría de entidad clínica independiente caracterizada por la existencia de una dismorfia facial típica, talla baja y cardiopatía (especialmente la estenosis pulmonar (EP) y la miocardiopatía hipertrófica (MCH)<sup>(4)</sup>. Van der Burgt *et al.* propusieron un método de diagnóstico clínico basado en la valoración de rasgos fenotípicos mayores y menores<sup>(5, 6)</sup>.

A partir de ahí, con el desarrollo de la genética molecular, fueron varios los intentos de identificar el gen responsable de este rasgo no infrecuente y de herencia dominante. La forma en la que se decidió abordar esta incógnita fue empleando estrategias de mapeo por ligamiento, basados en la identificación de asociación entre marcadores genéticos

polimórficos y el fenotipo patológico, en los distintos miembros de una misma familia preferentemente amplia. Jamieson *et al.* lograron definir un locus diana en la región distal del brazo largo del cromosoma 12 (12q22-qter)<sup>(7)</sup>, aunque percibieron que existía una cierta heterogeneidad genética, ya que no en todas las familias estudiadas existía co-segregación de los marcadores que definían esa región diana con el fenotipo patológico. Otros grupos llegaron a conclusiones similares, pero no lograron identificar el gen responsable<sup>(8, 9)</sup>.

En 2001, Tartaglia *et al.*<sup>(10)</sup> identificaron por primera vez mutaciones germinales de ganancia de función en el gen PTPN11 en dos familias no relacionadas con SN. Dada la implicación de su producto génico (la proteína SHP-2) en procesos centrales del desarrollo embrionario, PTPN11 fue propuesto como gen candidato. Este hallazgo situó en el centro de la diana a la vía Ras/MAPK, tradicionalmente ligada a cáncer, en la cual se identificaban por primera vez alteraciones en línea germinal asociadas a una patología congénita. Ahora sabemos que el gen PTPN11 es responsable de hasta un 50% de los casos de SN<sup>(11)</sup> y que además también se encuentra alterado en el síndrome LEOPARD (SL; MIM #151100). Esta patología, a diferencia de lo que ocurre en el SN, se debe a la pérdida de función del alelo mutado<sup>(12-14)</sup>. El SL es una entidad clínica mucho más infrecuente que presenta un fenotipo parcialmente solapado al SN, especialmente durante la infancia. El SL posee características diferenciales como la lentiginosis, la presencia de manchas café con leche, la sordera y la asociación a la miocardiopatía hipertrófica<sup>(15)</sup>. La ausencia o aparición tardía

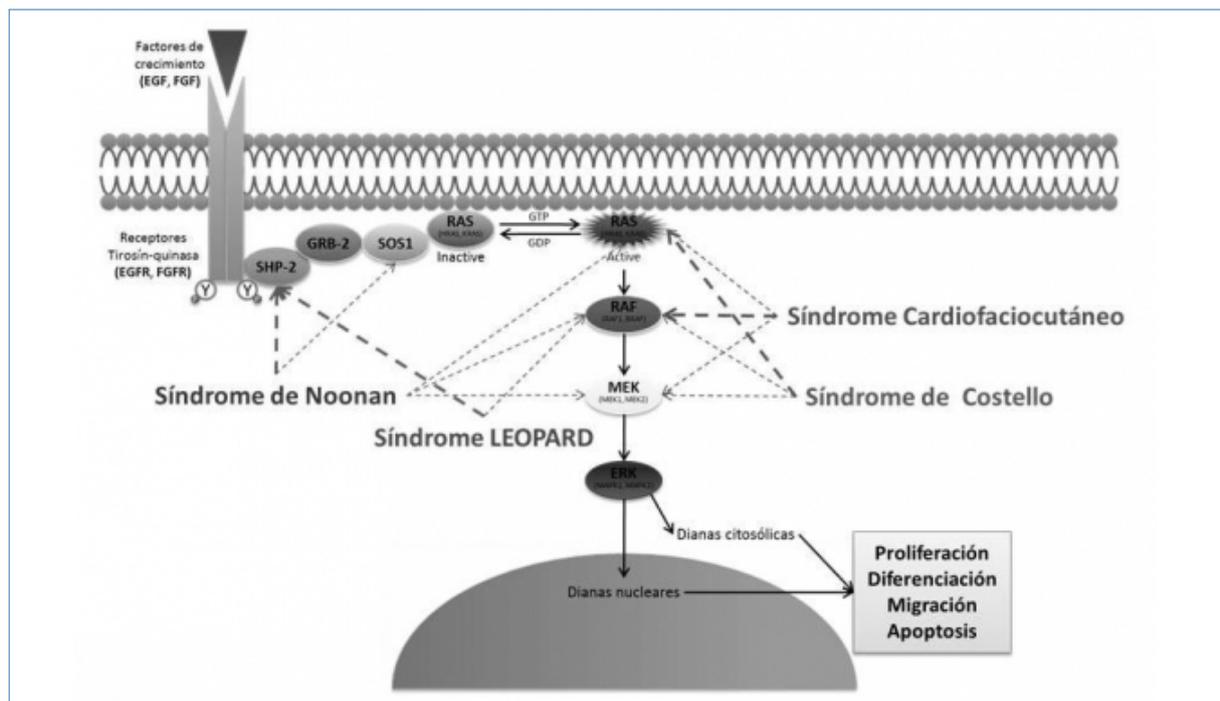


Figura 1. Genes de la vía Ras/MAPK y síndromes asociados

de alguna de estas manifestaciones, puede conducir a errores en el diagnóstico.

El reciente descubrimiento de mutaciones en otros genes de esta vía (KRAS, BRAF, SOS1, RAF1 o HRAS, entre otros) <sup>(16-22)</sup>, enfatizan la relación entre hiperactividad de la vía Ras/MAPK, la patogénesis del SN y la genética del cáncer. Esta conexión se extiende a otros síndromes parcialmente solapantes con el SN (síndrome cardiofaciocutáneo, SCFC; #MIM115150 y síndrome de Costello, SC; #MIM218040), que también se deben a mutaciones hipermórficas (sobreactivadoras) en genes de esta ruta <sup>(23, 24)</sup>. El caso de la Neurofibromatosis tipo I, que también comparte características con el SN es análogo, y se debe en este caso a la pérdida de función de una proteína (Neurofibromina) inhibidora de la vía Ras/MAPK <sup>(25)</sup>. Nuestro grupo ha documentado tres casos erróneamente diagnosticados de síndrome de neurofibromatosis-Noonan que finalmente fueron diagnosticados de SL en parte gracias al apoyo de los datos moleculares <sup>(26)</sup>.

El análisis de las primeras series poblacionales, pusieron de manifiesto la dependencia entre gen mutado y severidad clínica. Las alteraciones en los primeros genes de la cascada Ras/MAPK (PTPN11 y SOS1, figura 1) generan cuadros típicos del SN, caracterizados por la existencia de talla baja, facies típica, estenosis pulmonar y retraso mental leve o ausente. En cambio, mutaciones en KRAS o en ge-

nes que están por debajo en la vía de señalización (BRAF, RAF1 o HRAS), se asocian con más frecuencia a formas graves de la enfermedad, con aparición de facies más tosca, cardiopatías complejas y retraso mental grave <sup>(27-29)</sup>.

En enfermedades genéticas tales como éstas, potencialmente graves y originadas por mutaciones dominantes de penetrancia completa, resulta habitual identificar alteraciones *de novo* (aquellas generadas durante las etapas iniciales del desarrollo embrionario), ya que los pacientes afectados ven seriamente comprometida su capacidad para generar descendencia. Sin embargo, las mutaciones asociadas al SN generan un espectro clínico continuo, que va desde formas letales perinatales con hallazgos ecográficos prenatales, hasta formas oligosintomáticas o fenotipos evolutivos con escasa repercusión clínica en el adulto. Son éstos casos más leves, los que pueden llegar a transmitir la mutación, dando lugar a una forma familiar de la enfermedad. Esta expresividad variable, que sería consecuencia del efecto modulador de otros factores genéticos y/o epigenéticos, puede entrar en conflicto con la concepción clásica del SN como enfermedad monogénica. Recientemente han sido descritos varios pacientes con dos mutaciones en genes Ras/MAPK <sup>(30-33)</sup>. Sin embargo, esto no ha servido para aportar luz a la comprensión de la contribución parcial y el efecto aditivo de las mutaciones en los genes involucrados.

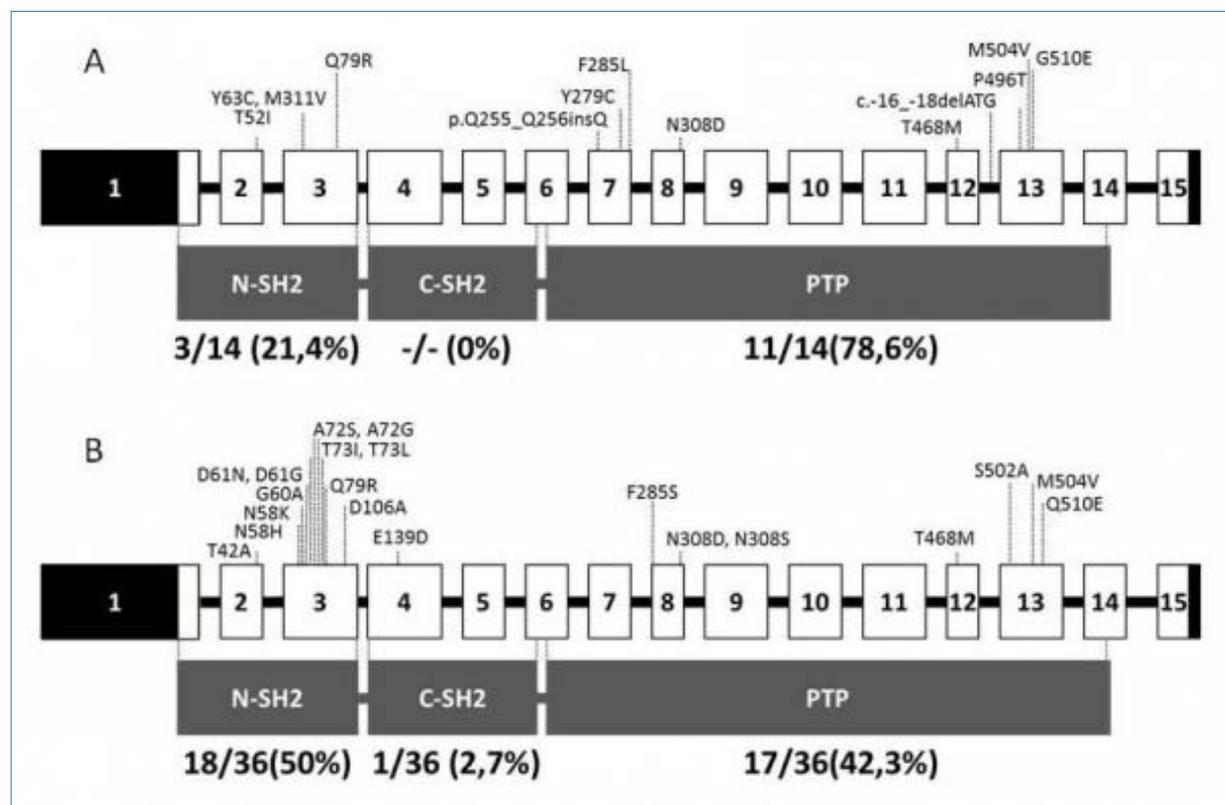


Figura 2. Distribución de las mutaciones de PTPN11 en formas familiares (A) y de novo (B)

La proporción de formas familiares descrita en el SN con mutaciones en PTPN11 es muy diversa (30–75%)<sup>(34)</sup>. Esta disparidad puede deberse a las dificultades que plantea un abordaje puramente clínico, lastrado por la escasez de rasgos clínicos objetivables, y la ausencia de marcadores bioquímicos específicos, que limitan el acceso a las pruebas moleculares que permiten confirmar la enfermedad. Desde nuestro grupo, se está intentado avanzar en esta dirección mediante la introducción de herramientas de análisis morfométrico para la valoración objetiva de los fenotipos faciales del SN y relacionados<sup>(35)</sup>.

Las formas familiares del SN merecen nuestra atención porque nos permiten identificar las mutaciones recurrentes, evaluar su distribución y estudiar su comportamiento diferencial o expresividad. En este trabajo, nos hemos planteado determinar en los estudios familiares realizados, la tasa de mutaciones esporádicas y recurrentes y obtener información sobre la expresividad de estas alteraciones en las familias con más de un caso positivo, así como presentar una pequeña selección de casos representativos que reflejen las particularidades del estudio del SN.

## PACIENTES Y MÉTODOS:

Se ha llevado a cabo un estudio retrospectivo de todas aquellas familias en las que se solicitó el análisis genético de al menos un pariente, además del caso índice, recopilando información tanto clínica como genotípica. En total se seleccionaron 76 familias (148 familiares) con sospecha de SN familiar. El análisis de mutaciones se llevó a cabo mediante PCR y secuenciación bidireccional de los exones recurrentes y regiones intrónicas adyacentes de los genes más prevalentes en SN. Para el gen PTPN11 se estudiaron los exones 2, 3, 4, 7, 8, 12 y 13; en el gen RAF1 los exones 7, 14 y 17; en el gen SOS1 los exones 3, 4, 6, 7, 10, 13, 14 y 16 y para BRAF los exones 6, 11, 12, 14 y 15. La valoración clínica de los pacientes fue realizada en origen por pediatras endocrinólogos y dismorfólogos pertenecientes a hospitales terciarios del ámbito nacional.

Los estudios genéticos se realizaron previo consentimiento informado por parte del clínico solicitante. Este estudio ha sido realizado en conformidad con la declaración de Helsinki y la legislación local vigente.

## RESULTADOS:

### Tasa de mutaciones recurrentes y distribución:

El rango de fenotipos observados varía desde formas letales perinatales con sospecha prenatal (higroma quístico o *hydrops fetalis*), hasta fenotipos

adultos atenuados/crípticos. Un 26,31% (20/76) de los estudios familiares solicitados fueron negativos (caso índice negativo). Entre las restantes 56 familias, se detectaron 37 casos índice con mutaciones *de novo* (PTPN11: 66,66%; 53,16% - 80,16%, incluido un paciente con mutación en RAF1), 15 formas familiares (PTPN11: 25,92%; 13,31% - 38,54%), con casos de herencia paterna (4/15) y materna (11/15), uno de ellos positivo para SOS1 y 4 casos positivos indeterminados, debido a que sólo fue posible el estudio de un único progenitor y además fue negativo.

La tabla 1 muestra un resumen de las formas familiares. En ella es posible evaluar la expresividad de las mutaciones heredadas, aunque se debe tener en consideración el carácter evolutivo de los fenotipos. Habitualmente nos encontramos con que el fenotipo de los hijos es más florido que el de sus padres porque suelen ser el caso índice familiar y por lo tanto quienes motivan en primer lugar el estudio genético. En 6/21 familiares con mutación no se informó de la presencia de fenotipo. En la figura 2 se representa la distribución de las mutaciones detectadas en formas familiares y *de novo* por dominios estructurales del gen PTPN11. En las formas *de novo*, se puede observar que el dominio que aglutina un mayor número de mutaciones es el N-SH2, especialmente el exón 3. Sin embargo, sólo representa el 50% (18/36) de los casos por la alta prevalencia de las mutaciones p.N308D y p.N308S (10 casos), que recaen sobre el exón 8 (dominio PTP). Las mutaciones en el dominio C-SH2 no son frecuentes en el SN como así queda demostrado en esta serie (1 caso). En las formas familiares la distribución de las mutaciones está mucho más sesgada. Once de catorce (78,6%) de las mutaciones familiares recaen sobre el dominio PTP, mientras que sólo 3/14 lo hacen sobre el N-SH2. En el dominio C-SH2 no se registró ningún caso familiar positivo.

### Casos representativos:

1- FAMILIA 65: Formas heredadas y *de novo* en una familia con mutación en PTPN11.

El caso índice, un varón de 9 años, presenta un fenotipo típico de SL con cardiopatía, talla baja, dismorfia facial, manchas café con leche, lentiginosis e hipoacusia. Su madre, sin cardiopatía, presenta también rasgos faciales y cutáneos. El estudio molecular del gen PTPN11 en esta familia puso de manifiesto la existencia de la mutación p.Y279C en el caso índice, heredada por vía materna. El análisis de los abuelos maternos no reveló ninguna alteración, lo que confirma que la mutación materna se originó *de novo*.

2- FAMILIA 192: Síndrome de Noonan esporádico por mutación en PTPN11 en familia con sospecha de síndrome LEOPARD.

PARENTESCO	FAMILIA	DNA	GEN	MUTACIONES <sup>1,2</sup>	DATOS CLÍNICOS
ÍNDICE	2	3	PTPN11	p.N308D (c.922A>G)	Estenosis pulmonar
Madre	2	2	PTPN11	p.N308D (c.922A>G)	Pterigium coli y talla baja
Hermano/a	2	8	PTPN11	p.N308D (c.922A>G)	Talla baja, retraso puberal y cardiopatía
Hermano/a	2	10	PTPN11	p.N308D (c.922A>G)	
ÍNDICE	21	31	PTPN11	p.T468M (c.1403C>T)	Miocardopatía hipertrófica, facies sugestiva, talla P50, manchas café con leche generalizadas y efélides en axila
Padre	21	284	PTPN11	p.T468M (c.1403C>T)	Miocardopatía hipertrófica, facies sugestiva, manchas café con leche y lentiginosis
Hermano/a	21	32	PTPN11	p.T468M (c.1403C>T)	Miocardopatía hipertrófica y facies típica
ÍNDICE	38	52	PTPN11	p.F285L (c.855T>C)	Estenosis pulmonar, talla baja y facies sugestiva (fenotipo compatible)
Madre	38	73	PTPN11	p.F285L (c.855T>C)	
ÍNDICE	53	67	PTPN11	p.M504V (c.1510A>G)	Estenosis pulmonar
Hijo/a	53	107	PTPN11	p.M504V (c.1510A>G)	
ÍNDICE	65	86	PTPN11	p.Y279C (c.836A>G)	Estenosis pulmonar leve, talla baja <P3, orejas bajas, cuello corto, hipotonía axial, manchas café con leche diseminadas, lentiginosis e hipoacusia.
Madre	65	85	PTPN11	p.Y279C (c.836A>G)	Macrocefalia, macrosomía, orejas bajas y prominentes, talla baja, lentiginosis, manchas café con leche
ÍNDICE	68	89	PTPN11	p.Q79R (c.236A>G)	Estenosis pulmonar
Madre	68	104	PTPN11	p.Q79R (c.236A>G)	
ÍNDICE	98	128	PTPN11	p.T52I (c.155C>T)	Estenosis pulmonar, talla baja, pectum carinatum, cuello corto ancho, baja implantación pelo, retraso psicomotor leve
Madre	98	127	PTPN11	p.T52I (c.155C>T)	
ÍNDICE	162	210	PTPN11	p.P491T (c.1471C>A)	Talla baja, trastorno alimentación y facies típica (fenotipo Noonan)
Padre	162	228	PTPN11	p.P491T (c.1471C>A)	Criptorquidia
ÍNDICE	206	266	PTPN11	p.Q510R (c.1529A>G)	Talla baja, lentiginosis
Padre	206	555	PTPN11	p.Q510R (c.1529A>G)	
ÍNDICE	215	278	PTPN11	p.N308D (c.922A>G)	Estenosis pulmonar leve, hendiduras antimongoloides, orejas plegadas y rotadas, cuello corto y ancho
Madre	215	544	PTPN11	p.N308D (c.922A>G)	Talla baja, facies tosca y sugestiva y retraso mental

ÍNDICE	248	324	PTPN11	p.N308D (c.922A>G)	Facies típica, pectum excavatum
Madre	248	323	PTPN11	p.N308D (c.922A>G)	Estenosis pulmonar, facies típica, talla baja, pectum excavatum
ÍNDICE	273	351	PTPN11	p.Q256insQ (c.766insCAA)	Facies sugestiva, pterigium coli, torax ancho, implantación baja orejas, talla baja.
Madre	273	383	PTPN11	p.Q256insQ (c.766insCAA)	Facies sugestiva, pterigium coli, orejas implantación baja, talla muy baja
Hermano/a	273	434	PTPN11	p.Q256insQ (c.766insCAA)	Estenosis pulmonar, facies típica, pterigium coli, pectum carinatum, talla baja, retraso psicomotor leve y linfedema
ÍNDICE	306	392	PTPN11	p.[Y63C; p.M311V] (c.188A>G; c.931A>G)	Leucemia mielomonocítica juvenil, facies típica, implantación baja de orejas, retraso psicomotor, pectum carinatum
Madre	306	447	PTPN11	p.[Y63C; p.M311V] (c.188A>G; c.931A>G)	Facies típica, hipertelorismo, implantación baja de cabello y orejas, ptosis, talla baja, retraso psicomotor, disgenesia gonadal
Hermano/a	306	448	PTPN11	p.[Y63C; p.M311V] (c.188A>G; c.931A>G)	Facies típica, hipertelorismo, implantación baja de cabello y orejas, ptosis, talla baja, criptorquidia
Abuelo/a materno/a	306	450	PTPN11	p.[Y63C; p.M311V] (c.188A>G; c.931A>G)	Facies típica, hipertelorismo, implantación baja de cabello y orejas, ptosis, talla baja, retraso psicomotor y retraso puberal
Tío/a materno/a	306	449	PTPN11	p.[Y63C; p.M311V] (c.188A>G; c.931A>G)	Facies típica, hipertelorismo, implantación baja de cabello y orejas, ptosis, talla baja, retraso psicomotor y criptorquidia
ÍNDICE	328	419	SOS1	p.R552W (c.1654A>T)	Estenosis pulmonar, dismorfia facial típica y criptorquidia
Padre	328	681	SOS1	p.R552W (c.1654A>T)	Criptorquidia bilateral, talla normal
Madre	403	512	PTPN11	p.Y63C (c.188A>G)	Talla baja, hipertelorismo, hendiduras antimongoloides, implantación baja de orejas e implantación baja de cabello
ÍNDICE	403	637	PTPN11	p.Y63C (c.188A>G)	Hydrops fetalis, exitus perinatal

<sup>1</sup> Posiciones nucleotídicas respecto a la secuencia de referencia MN\_0056633.3.

<sup>2</sup> Posiciones aminoácidas respecto a la secuencia de referencia NP\_0056624.2.

Tabla 1. Resumen de las formas familiares del síndrome de Noonan

Estamos ante un caso de sospecha de SL familiar por la existencia de fenotipo en el caso índice y en su padre. El probando presenta un fenotipo completo con facies típica, estenosis pulmonar y criptorquidia. En su madre, la sospecha se origina por la existencia de múltiples efélides. El análisis mediante secuenciación del gen PTPN11 puso de manifiesto la existencia de la mutación p.N308D *de novo* en el hijo. Este caso pretende ilustrar cómo la inespecificidad de algunos rasgos y la dificultad para valorarlos (efélides), pueden conducir a una sospecha diagnóstica equivocada por la dificultad que plantea el diferenciarlos de los verdaderos signos clínicos (lentiginosis). Es este caso, de una sospecha inicial de SL familiar, se pasó a un diagnóstico confirmatorio de SN *de novo*.

3- FAMILIA 215: Síndrome de Noonan en familia con fenotipo en ambos progenitores.

Se trata de un varón con cardiopatía, facies sugestiva, microcefalia y retraso mental leve (valorado a los 6 años) remitido para estudio molecular del SN, junto con sus padres, ambos con fenotipo. La madre presenta talla baja, dismorfia facial y retraso mental, y el padre tiene talla baja y retraso mental. El interés de esta familia estriba en la necesidad de recalcar la inespecificidad de los criterios clínicos diagnósticos, que pueden generar ambigüedad, cuando los fenotipos no son completos o poco expresivos. La confirmación diagnóstica se obtuvo tras el análisis del gen PTPN11, que concluyó la existencia de la mutación p.N308D en el caso índice y en su madre.

4- FAMILIA 328: Forma familiar de síndrome de Noonan por mutación en SOS1.

El impacto de otros genes de la vía Ras/MAPK, aparte de PTPN11, es variable. La repercusión de ciertos genes como KRAS que inicialmente en esta patología había sido sobrevalorada, han quedado como genes de menor prevalencia. Otros, de reciente descubrimiento como SOS1, son mucho más recurrentes y se deben tener presente por la similitud de los fenotipos que origina respecto a PTPN11. El caso índice es un varón de 5 años con estenosis pulmonar, dismorfia facial típica y criptorquidia. Su padre refiere antecedentes de criptorquidia, intervenida en su infancia, y tiene talla normal. El estudio de PTPN11 no desveló ninguna alteración. La existencia de cardiopatía y criptorquidia motivaron el posterior análisis del gen SOS1, que reveló la presencia de la mutación p.R552W en ambos individuos.

5- FAMILIA 403: Forma letal perinatal en familia con mutación en PTPN11 de expresividad variable.

Las mutaciones en PTPN11 pueden originar cuadros muy graves, con malformaciones asociadas

visibles incluso prenatalmente. Este es el caso de una gestante con "fenotipo Turner" (talla baja, hipertelorismo, hendiduras palpebrales antimongoloides, implantación baja de orejas e implantación baja del cabello) con alteraciones ecográficas durante la gestación (*hydrops fetalis*). Tras el nacimiento, se remitieron muestras de madre e hijo para estudio molecular. Se detectó la mutación p.Y63C en ambos, confirmándose el diagnóstico de SN. El hijo falleció al mes de vida a consecuencia de la severidad de las múltiples malformaciones. La expresividad variable es un rasgo característico de las mutaciones relacionadas con el SN. Por el momento, resulta imposible predecir el efecto de una alteración heredada.

6- FAMILIA 494: Mutación y polimorfismo *de novo* en PTPN11.

La aparición de una nueva variante genética, salvo que existan mecanismos subyacentes que favorezcan su aparición, ha de considerarse como un evento fortuito, cuya frecuencia se estima en 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-9</sup> nucleótidos. La singularidad de este caso radica en la detección de dos eventos *de novo* en el caso índice: c.179G>C (p.G60A) y c.195G>C (p.65L) sobre el mismo gen, este caso sobre PTPN11. Respecto a la valoración del hallazgo, éste no supone ningún reto añadido, ya que la segunda variante es neutra. Sin embargo, aún hoy en día se siguen detectando nuevas variantes genéticas, cuyo efecto es en ocasiones difícil de predecir. Para su valoración, existen aproximaciones *in vitro* (estudios de expresión) e *in silico* (software de predicción), cuyos resultados deben trasladarse al ámbito clínico con cautela.

## DISCUSIÓN:

La reciente incorporación de las herramientas de diagnóstico molecular al estudio del SN, había limitado, hasta el momento, el acceso al conocimiento de su base genética. Se han identificado algunos genes de la vía Ras/MAPK como responsables del desarrollo de la enfermedad, sin embargo, aproximadamente un 30% de los pacientes que reúnen los criterios clínicos de diagnóstico no tienen alteraciones en los genes estudiados. El diagnóstico genético confirmatorio permite plantear estrategias terapéuticas (quirúrgicas y farmacológicas) más específicas, proporciona información a la familia sobre el riesgo de transmisión de la enfermedad y permite realizar ciertas predicciones sobre la evolución de la enfermedad (riesgo de cáncer, cardiopatías, etc.)<sup>(36; 37)</sup>. A la espera de la identificación de nuevos genes diana en otras vías de señalización relacionadas, no debemos descartar que parte de los casos no caracterizados se puedan tratar de fenocopias, con una base genética totalmente dife-

rente y que se asemejen clínicamente al SN.

Las formas familiares del SN no son infrecuentes (aproximadamente un cuarto de los casos en nuestra serie) y se relacionan habitualmente con genes cuyas mutaciones originan los fenotipos menos severos (PTPN11 y SOS1). Sin embargo, como hemos documentado, estos genes también pueden generar cuadros muy graves de la enfermedad e incluso formas letales. En la literatura hay referencias acerca de la existencia de un sesgo en la proporción de afectos por sexo, a favor de los hombres en relación 2:1, que en teoría tendría su explicación en una mayor supervivencia de los embriones de sexo masculino. Sin embargo, parece que es más frecuente que sean las madres quienes transmiten el síndrome, alegando una disminución de la fertilidad de los varones, debida en parte a la criptorquidia (38). Con el paso del tiempo no se han hecho nuevas apreciaciones al respecto. En nuestra serie, hemos encontrado también un predominio materno en la segregación de los alelos mutantes (11/15 casos familiares de herencia materna). En cambio, resulta llamativo que dos de los cuatro padres afectados tenían criptorquidia.

Cabe destacar que en 6 de las 15 familias no se informó de fenotipo en algún pariente afecto, es decir, más de un tercio son casos detectados a raíz del resultado positivo de un familiar. Este dato puede ser interpretado a dos niveles: por un lado, pone de manifiesto que la evolución favorable de los fenotipos faciales limita la sospecha diagnóstica en el adulto; y por otro, remarca la necesidad del estudio de familiares directos (padres, hijos o hermanos) tras la identificación de un caso positivo, por las repercusiones de la existencia de una forma familiar en el consejo genético. La incidencia del SN documentada en los trabajos clásicos se ha estimado aproximadamente en 1:2.000 (39). Este dato, que incluso podría estar infraestimado por la existencia de pacientes oligosintomáticos que pueden transmitir la enfermedad, resulta sorprendentemente alto por la importancia de los genes implicados y por las potenciales repercusiones clínicas en los pacientes. Hasta el momento, no se han identificado mecanismos que favorezcan la aparición de mutaciones en los genes involucrados en el SN.

Un 25% de los estudios familiares solicitados no estaban justificados ya que el caso índice era negativo. La ansiedad en los progenitores, junto con la segregación de la mutación detectada para consejo genético, los estudios prenatales y la confirmación de fenotipos parciales fueron los motivos de estudio más frecuentes. A pesar de que en los estudios moleculares limitados al análisis de regiones recurrentes, la existencia de un resultado negativo no descarta la enfermedad, los nuevos abordajes masivos basados en la tecnología de *arrays* de

ADN o secuenciación de nueva generación, tampoco están recomendados por la complejidad del análisis de los datos que generan y la valoración de las variantes detectadas (40).

Con este trabajo hemos podido documentar una distribución diferencial de las mutaciones esporádicas y heredadas del gen PTPN11 en las familias con SN. La proteína codificada por PTPN11, posee dos dominios reguladores (N-SH2 y C-SH2, ambos imprescindibles para el mantenimiento de la estructura auto-inhibida de la proteína) y un dominio catalítico (PTP). Hemos detectado una mayor prevalencia de las mutaciones del dominio PTP en las formas familiares, por lo que se podría especular que su efecto patogénico debe ser menor. Las mutaciones germinales de PTPN11 asociadas a síndromes mieloproliferativos se localizan en el exón 3 (dominio N-SH2). Para estas variantes, el nivel de actividad *in vitro* es mayor que el documentado para variantes que inciden sobre otros dominios. Por lo tanto, resulta coherente que la mayor parte de las mutaciones más patogénicas aparezcan como eventos *de novo*. La probabilidad de existencia de un mosaicismo germinal, aunque es remota, debe tenerse en consideración puesto que ha sido ya documentado en el SN (41). Los casos clínicos presentados pretenden abundar sobre aspectos relevantes del SN: la presencia de formas *de novo*/familiares, la expresividad variable de las mutaciones relacionadas, la implicación de otros genes relacionados, las limitaciones del diagnóstico clínico y la valoración de los hallazgos moleculares.

Los hallazgos de los últimos años, engloban al SN dentro con una constelación de síndromes polimalformativos asociados a cardiopatía, retraso mental y predisposición al desarrollo de neoplasias, cuyo denominador común es la existencia de alteraciones en los genes de la vía de transducción de señales Ras/MAPK. A medida que se avanza en el conocimiento de la base molecular, se hace más evidente la dificultad que supone el abordaje de estas enfermedades desde un punto de vista clínico. El análisis molecular se ha vuelto tan complejo como necesario, puesto que aporta evidencias diagnósticas objetivas y permite una clasificación más precisa de los pacientes. Para llevarlo a cabo de forma eficiente, es imprescindible la incorporación de herramientas de cribado genotípico. El análisis de curvas de fusión de alta resolución (en inglés *High Resolution Melting* o HRM) es una alternativa sencilla, económica y eficaz a otras técnicas como SSCP, DGGE o DHPLC para el despistaje de mutaciones/variantes. Pese a los avances, aún persisten muchas cuestiones por resolver. La existencia de un 30% de pacientes SN sin caracterización genotípica o la existencia de patrones pseudo-autosómico-recesivos o las variantes de expresividad, motivan aún más si cabe, los esfuerzos en esta línea de in-

vestigación. Quizás, nuestro trabajo sobre la determinación de los perfiles de expresión de los genes Ras/MAPK en estos pacientes, permita la identificación de marcadores bioquímicos para la valoración a priori de la potencial implicación de estos genes y por lo tanto de la conveniencia de su estudio <sup>(42)</sup>. De un mejor abordaje molecular se beneficiará el diagnóstico clínico, por las asociaciones entre genotipo y fenotipo que se podrán derivar. Todo ello redundará en una mejor estratificación clínica de los pacientes a quienes se les podrá aplicar algoritmos diagnósticos más dirigidos.

## CONCLUSIONES:

- El porcentaje de formas familiares en nuestra población es similar al documentado previamente y las mutaciones asociadas a éstas afectan con menor frecuencia al dominio N-SH2.
- La expresividad de las alteraciones en PTPN11 es muy variable, según los estudios comparativos intra/inter-familiares.
- La existencia de fenotipos parciales/oligosintomáticos en el adulto sugiere que la detección real de la enfermedad podría haber estado infraestimada y justifica el estudio molecular en los familiares.
- El diagnóstico molecular proporciona información diagnóstica objetiva, de gran interés por la existencia de fenotipos que se solapan parcialmente con otras patologías que involucran a la vía RAS/MAPK.

## Abreviaturas:

SN: Síndrome de Noonan; SL: Síndrome LEOPARD; SC: Síndrome de Costello; SCFC: Síndrome cardio-faciocutáneo; EP: Estenosis de la válvula pulmonar; MCH: Miocardiopatía hipertrófica; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; HRM: High resolution melting (análisis de curvas de fusión de alta resolución).

## Referencias Bibliográficas

1. Kobylinski O. Ueber eine flughoutahnbiche ausbreitung. *Am. Halse. Arch. Anthropol.* 1883;14:342-48.
2. Ullrich O. Uber typische kombinationbildermultipler abanturgen. *Z. Kinderheilkd* 1930;49:271-76.
3. Noonan J., Ehmke D. Associated non cardiac malformations in children with congenital heart disease. *J. Pediatr.* 1963;63:468-70.
4. Opitz JM. The Noonan syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1985;21:515-18.
5. Duncan WJ, Fowler RS, Farkas LG, Ross RB, Wright AW, Bloom KR, et al. A comprehensive scoring system for evaluating Noonan syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1981;10(1):37-50.
6. 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 Nov;53(2):187-191.
7. Jamieson CR, van der Burgt I, Brady AF, van Reen M, Elswawi MM, Hol F, et al. Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12. *Nat. Genet.* 1994 Dic;8(4):357-360.
8. Legius E, Schollen E, Matthijs G, Fryns JP. Fine mapping of Noonan/cardio-facio cutaneous syndrome in a large family. *Eur. J. Hum. Genet.* 1998 Ene;6(1):32-37.
9. Ion A, Crosby AH, Kremer H, Kenmochi N, Van Reen M, Fenske C, et al. Detailed mapping, mutation analysis, and intragenic polymorphism identification in candidate Noonan syndrome genes MYL2, DCN, EPS8, and RPL6. *J. Med. Genet.* 2000 Nov;37(11):884-886.
10. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 2001 Dic;29(4):465-468.
11. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;70(6):1555-1563.
12. Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, Marino B, et al. Grouping of multiple-lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2002 Ago;71(2):389-394.
13. Legius E, Schrandt-Stumpel C, Schollen E, Pulles-Heintzberger C, Gewillig M, Fryns J-P. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *J. Med. Genet.* 2002 Ago;39(8):571-574.
14. Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, et al. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2006 Feb;78(2):279-290.
15. Sarkozy A, Digilio MC, Dallapiccola B. Leopard syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:13.
16. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 2006;38(3):331-336.
17. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat. Genet.* 2006;38(3):294-296.
18. Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noo-

- nan syndrome. *Nat.Genet.* 2007;39(1):75-79.
19. Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, et al. Germline gain-of-function mutations in *SOS1* cause Noonan syndrome. *Nat.Genet.* 2007;39(1):70-74.
  20. Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, et al. Germline gain-of-function mutations in *RAF1* cause Noonan syndrome. *Nat.Genet.* 2007;39(8):1013-1017.
  21. Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function *RAF1* mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat.Genet.* 2007;39(8):1007-1012.
  22. Rauen KA. HRAS and the Costello syndrome. *Clin.Genet.* 2007;71(2):101-108.
  23. Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, et al. Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J.Med.Genet.* 2007;44(12):763-771.
  24. Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Neri G, Cave H, Verloes A, et al. Molecular and clinical characterization of cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: overlapping clinical manifestations with Costello syndrome. *Am.J.Med.Genet.A.* 2007;143A(8):799-807.
  25. Huffmeier U, Zenker M, Hoyer J, Fahsold R, Rauch A. A variable combination of features of Noonan syndrome and neurofibromatosis type I are caused by mutations in the *NF1* gene. *Am.J.Med.Genet.A.* 2006;140(24):2749-2756.
  26. Carcavilla A, Pinto I, Muñoz-Pacheco R, Barrio R, Martín-Frías M, Ezquieta B. LEOPARD syndrome (PTPN11, T468M) in three boys fulfilling neurofibromatosis type 1 clinical criteria. *Eur. J. Pediatr.* 2011 Ago;170(8):1069-1074.
  27. 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 Ago;29(8):992-1006.
  28. Zenker M. Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors. *Curr. Opin. Pediatr.* 2011 Ago;23(4):443-451.
  29. Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011 Feb;25(1):161-179.
  30. Thiel C, Wilken M, Zenker M, Sticht H, Fahsold R, Gusek-Schneider G-C, et al. Independent *NF1* and *PTPN11* mutations in a family with neurofibromatosis-Noonan syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* 2009 Jun;149A(6):1263-1267.
  31. Brasil AS, Malaquias AC, Wanderley LT, Kim CA, Krieger JE, Jorge AAL, et al. Co-occurring *PTPN11* and *SOS1* gene mutations in Noonan syndrome: does this predict a more severe phenotype? *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010 Nov;54(8):717-722.
  32. Longoni M, Moncini S, Cisternino M, Morella IM, Ferraiuolo S, Russo S, et al. Noonan syndrome associated with both a new *Jnk*-activating familial *SOS1* and a *de novo* *RAF1* mutations. *Am. J. Med. Genet. A* 2010 Sep;152A(9):2176-2184.
  33. Ekvall S, Hagenäs L, Allanson J, Annerén G, Bondeson M-L. Co-occurring *SHOC2* and *PTPN11* mutations in a patient with severe/complex Noonan syndrome-like phenotype. *Am. J. Med. Genet. A* 2011 Jun;155A(6):1217-1224.
  34. Allanson JE, Roberts AE. Noonan Syndrome [Internet]. 2011, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1124/>
  35. Carcavilla A, Reig S, Santomé Collazo L, Ezquieta B. Morphometric analysis of facial photographs as a diagnostic tool in Noonan syndrome. *Horm Res Paediatr* 74(suppl 3) 2010: 106.
  36. Formigari R, Michielon G, Digilio MC, Piacentini G, Carotti A, Giardini A, et al. Genetic syndromes and congenital heart defects: how is surgical management affected? *Eur J Cardiothorac Surg* 2009 Abr;35(4):606-614.
  37. Charron P, Arad M, Arbustini E, Basso C, Bilinska Z, Elliott P, et al. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* 2010 Nov;31(22):2715-2726.
  38. Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:45-68.
  39. Nora JJ, Nora AH, Sinha AK, Spangler RD, Lubs HA. The Ullrich-Noonan syndrome (Turner phenotype). *Am. J. Dis. Child.* 1974 Ene;127(1):48-55.
  40. Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, et al. Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics* 2010 Oct;126(4):746-759.
  41. Elalaoui SC, Kraoua L, Liger C, Ratbi I, Cavé H, Sefiani A. Germinal mosaicism in Noonan syndrome: A family with two affected siblings of normal parents. *Am. J. Med. Genet. A* 2010 Nov;152A(11):2850-2853.
  42. Santomé Collazo JL, Carcavilla A, Ezquieta B. Molecular diagnosis of Noonan syndrome: experience recorded and new insights. *Horm Res* 2011;76(suppl 2): 104.

### Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen Conflictos de Interés Potenciales.

Becas: José Luis Santomé Collazo disfrutó durante la realización del estudio de un contrato de investigación financiado por la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón, dentro.