

## ¿DE LA CLÍNICA AL GEN, O DEL GEN A LA CLÍNICA?

## Síndrome de Noonan

Atilano Carcavilla, Jose L. Santomé, Liliana Galbis, Begoña Ezquieta

*Laboratorio Diagnóstico Molecular . Servicio de Bioquímica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Madrid.*

**Introducción**

El síndrome de Noonan (SN) es un trastorno genético de herencia autosómica dominante relativamente frecuente. Clásicamente se ha descrito como la asociación de talla baja, dismorfias craneofaciales (fundamentalmente hipertelorismo, inclinación hacia abajo de las hendiduras palpebrales, ptosis palpebral, pabellones auriculares rotados y de implantación baja, hélix grueso), cardiopatía congénita (característicamente estenosis pulmonar valvular (EP) y miocardiopatía hipertrófica (MCH)), malformaciones torácicas (pectus excavatum/carinatum, tórax amplio) y criptorquidia en los varones.

En la última década los avances en genética molecular del SN impulsados por el descubrimiento del primer gen<sup>1</sup> han revolucionado el panorama de esta enfermedad. La progresiva descripción de genes implicados en esta y otras enfermedades clínicamente solapantes como la neurofibromatosis tipo 1 o el síndrome de Costello ha conducido a incluir al SN en un espectro más amplio de enfermedades denominado "Familia de los síndromes neuro-cardio-facio-cutáneos" que describimos más adelante.

En los últimos 7 años nuestro grupo ha realizado un estudio genético molecular a más de 900 pacientes con sospecha de SN u otras entidades relacionadas<sup>2</sup>. En el presente Capítulo presentamos los datos obtenidos de dicho estudio publicados recientemente, la valoración de formas familiares, y los resultados de un estudio de correlación genotipo-fenotipo en un subgrupo de 105 pacientes con descripción clínica completa.

Por último, describimos algunos avances sobre el diagnóstico prenatal de SN así como detalles del consejo genético.

**Breve historia de los hallazgos genéticos en el síndrome de Noonan y relacionados**

En 1968, Jacqueline Noonan describió por primera vez una serie de 19 pacientes con las características propias del SN<sup>3</sup>. Probablemente no era la primera descripción de pacientes con SN, pero sí se trataba de la primera serie en la que había pacientes de ambos sexos, había casos familiares, y el cariotipo era normal en todos. Antes de que se supiera que el síndrome de Turner se debía a una anomalía de los cromosomas sexuales, Flavell introdujo el término "Turner de los varones" para designar a estos pacientes, lo que condujo a una considerable confusión que aún colea en nuestros días. Cuando los estudios citogenéticos comenzaron a estar disponibles de forma generalizada, algunos de los pacientes previamente etiquetados de síndrome de Turner fueron reconocidos como pacientes con SN. Sin embargo, los estudios encaminados a encontrar anomalías cromosómicas en los pacientes con SN resultaron infructuosos pese al vigor con que se emprendieron.

No fue hasta la década de los 90 que se comenzó a acotar una zona del genoma que podría estar involucrada en la etiopatogenia del síndrome. La mayoría de familias descritas sugerían una forma de herencia autosómica dominante, y se había podido demostrar que no era un trastorno alélico de la neurofibromatosis tipo 1, con la que compartía múltiples características. El abordaje inicial consistió en realizar estudios de ligamiento genético en familias con el síndrome, con lo que se consiguió identificar varios marcadores en una zona del brazo largo del cromosoma 12 que se denominó NS1. Ya entonces, los estudios de ligamiento permitieron documentar que el SN era genéticamente heterogéneo<sup>4</sup>. Estudios posteriores permitieron refinar el locus NS1 a una longitud de 5 cm, y a partir de ese momento se

adoptó una estrategia de identificación de genes candidatos. Fue así como en 2001 Tartaglia *et al*<sup>1</sup> publicaron el hallazgo de que las mutaciones en el gen PTPN11, que codifica para la proteína SHP2, provocan el SN. PTPN11 era un candidato excelente porque se encuentra en el locus NS1, y porque su producto, SHP2, juega un papel esencial en cascadas de señalización intracelular implicadas en varios procesos de morfogénesis, entre otros la valvulogénesis.

Una de las características clínicas singulares en el SN es la alta frecuencia de trastornos hematológicos y leucemias<sup>5</sup>. La investigación de mutaciones en PTPN11 en pacientes con SN identificó una sustitución en particular, la p.Thr73Ile, que se asociaba con mucha frecuencia a un trastorno hematológico infrecuente, la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ). La asociación entre dicho residuo y el papel clave de SHP2 en la señalización RAS hizo pensar que un tipo diferente de lesiones en PTPN11, posiblemente de tipo somático, podrían estar implicadas en el desarrollo de neoplasias hematológicas. De hecho, la investigación posterior sostuvo esta hipótesis y se pudo demostrar la existencia de mutaciones somáticas en PTPN11 hasta en un tercio de pacientes con LMMJ aislada, así como en otros trastornos hematológicos.

De la mano de este hallazgo se llegó a la conclusión de que estas variantes de secuencia en PTPN11 conducían a una ganancia de función de su producto, SHP2, y finalmente al incremento de la actividad de la cascada de señalización intracelular RAS-MAPK. Algunos autores hipotetizaron entonces que los genes que codificaban para alguna de las proteínas implicadas en esta cascada de señalización podían estar involucradas en esa mitad de pacientes con diagnóstico de SN. Dado que el estudio de familias con síndrome de Noonan PTPN11 negativas no había aportado suficiente información para desarrollar nuevos estudios de ligamiento, los genes de la vía RAS-MAPK constituían un buen elenco de candidatos para continuar la investigación en pacientes negativos. Así ha sido como en los últimos años se han encontrado mutaciones en otros genes de la vía RAS-MAPK como KRAS<sup>6</sup>, RAF1<sup>7</sup>, BRAF<sup>8</sup>, NRAS<sup>9</sup> y SOS1<sup>10</sup> (Tabla 1). En todos ellos se ha podido demostrar que las alteraciones que dan lugar a los síndromes neurocardiofaciocutáneos son mutaciones de cambio de aminoácido (*missense*) que conducen a una ganancia de función, y al consecuente aumento de señalización intracelular<sup>11</sup>. Cabe señalar que, al menos en el caso de los dos genes más fuertemente asociados al fenotipo Noonan, PTPN11 y SOS1, también se han descrito alteraciones recesivas de pérdida de función (incluyendo en este caso pequeñas deleciones y cambios de aminoácido que originan pérdida funcional). En estos casos las entidades clínicas relacionadas afectan de forma

más local a tejidos concretos, como es el caso de la fibromatosis gingival<sup>12</sup> y la metacondromatosis<sup>13</sup> para SOS1 y PTPN11, respectivamente (Tabla 1). En estos casos podría existir un mecanismo de pérdida del segundo alelo (generalmente por deleción) en el tejido localmente afectado.

### Trastornos de la vía RAS-MAPK o síndromes neuro-cardio-facio-cutáneos: patogénesis y claves clínicas

La combinación sinérgica de la investigación clínica, en genética molecular, los modelos predictivos funcionales, los estudios de función *in vitro*, y los modelos animales, ha contribuido a identificar causas genéticas yuxtapuestas en una serie de enfermedades clínicamente solapadas, e identificar todas ellas como el producto de alteraciones en la regulación de la cascada de señalización intracelular RAS-MAPK (Figura 1). De ahí que se haya acuñado la denominación de "Familia de los síndromes neuro-cardio-facio-cutáneos". Algunos autores las han denominado conjuntamente trastornos RAS-MAPK o rasopatías, lo que estrictamente incluiría otros trastornos debidos a alteraciones de la regulación de las RAS-MAPK además de los síndromes neuro-cardio-facio-cutáneos (Tabla 1). Presentamos aquí una descripción de cada uno de estos síndromes (Figura 2) y los datos relativos a la caracterización molecular de un amplio grupo de pacientes en nuestra población<sup>2</sup> (Figura 3).

#### Neurofibromatosis tipo 1

La neurofibromatosis tipo 1 (NF) es un trastorno neurocutáneo autosómico dominante aparentemente no relacionado con el SN, aunque a un observador atento no se le escapará que muchos pacientes con NF poseen algunos rasgos fenotípicos propios del SN, como puede ser algunas dismorfias faciales, la talla baja, o con menos frecuencia, la EP. El extremo de esta asociación se encuentra en el síndrome de Noonan-Neurofibromatosis (SNNF), el cual se ha descrito como la asociación de ambas entidades en un paciente, y sabemos que se debe en la mayoría de los casos a mutaciones en el gen NF1. La razón de esta similitud clínica reside en la función de la proteína para la que codifica NF1. La neurofibromina es una proteína que actúa interaccionando negativamente con RAS favoreciendo su conformación inactiva, con lo que las deleciones y mutaciones descritas en NF1, que condicionan un defecto de función en la proteína, tienden una vez más a producir un aumento de la señalización en la vía RAS-MAPK.

#### Síndrome cardiofaciocutáneo

La descripción original del síndrome cardiofaciocutáneo (CFC) data de 1986, y fue seguida de

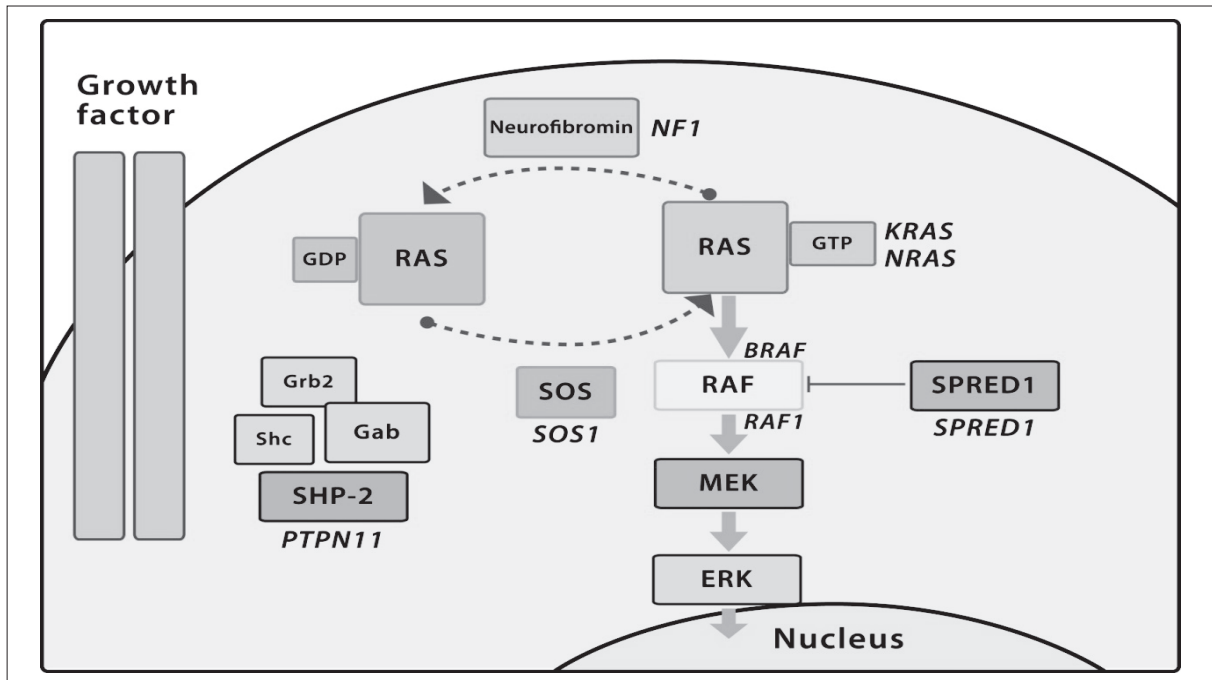


Figura 1. Cascada RAS-MAPK. La unión de un factor de crecimiento a un receptor tirosín quinasa activa a efectores intracelulares como SHP2, que a su vez reclutan intercambiadores de guaninas como SOS1, que promueven el intercambio GDP/GTP en las proteínas RAS, las cuales se activan por fosforilación. RAS-GTP activa consecuentemente las distintas isoformas de RAF (RAF1, BRAF), MEK (MEK1, MEK2), y por último ERK.

considerable controversia acerca de si se trataba realmente de una entidad sindrómica diferenciada o tan sólo de una variante del SN. Su particularidad clínica reside en que se trata de un trastorno esporádico, menos frecuente que el SN, con alta prevalencia de retraso mental, facies parecida a la del SN pero más tosca y que apenas mejora con la edad, y afectación cutánea frecuente (hiperqueratosis, cejas escasamente pobladas, cabello escaso y rizado).

Los estudios moleculares han permitido descartar que PTPN11 se encuentre mutado en el CFC, así como identificar mutaciones en BRAF, MEK1, MEK2, y algún caso aislado en KRAS, apoyando la tesis de que el CFC es una entidad distinta del SN, aunque algunos detalles fenotípicos se solapan considerablemente.

Tabla 1. Síndromes y entidades clínicas derivadas de alteraciones germinales de los genes RAS-MAPK.

Síndrome	Genes descritos
Síndrome de Noonan	PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS, BRAF, MEK1, NRAS, CBL
Síndrome de LEOPARD	PTPN11, RAF1, BRAF
Síndrome cardiofaciocutáneo	BRAF, KRAS, MEK1, MEK2
Síndrome de Costello	HRAS
Neurofibromatosis tipo 1	NF1
Síndrome de Noonan-Neurofibromatosis	NF1
Síndrome de Legius	SPRED1
Síndrome Noonan-like con lesiones múltiples de células gigantes.	PTPN11
Síndrome Noonan-like con pelo anágeno suelto	SHOC-2
Malformación capilar-Malformación arteriovenosa	RASA1
Síndrome linfoproliferativo autoinmune	NRAS
Fibromatosis gingival 1	SOS1
Metacondromatosis	PTPN11

## Síndrome de Costello (SC)

El SC fue descrito por primera vez en 1977 por Costello. Sus características clínicas incluían peso alto al nacer, problemas para alimentarse en el periodo neonatal con posterior retraso ponderoestatural, retraso psicomotor, papilomas peribucales, piel redundante en plantas y palmas con surcos profundos, y una facies tosca que recordaba a la del SN y la del CFC en la infancia. No fue hasta la década de los 90 en que comenzaron a describirse tumores sólidos malignos con más frecuencia en este síndrome, particularmente el rhabdomyosarcoma y el cáncer de vejiga. Entre otras manifestaciones de interés para el endocrinopediatra, se han descrito casos de hiperinsulinismo asociado al SC. En 2005 Aoki *et al*<sup>14</sup> demostraron que las mutaciones germinales en HRAS, otro gen de la familia de las RAS-MAPK, causaba SC. Ilustrando la dificultad de distinguir el SC del CFC, algunos pacientes que se consideraba tenían SC tenían finalmente mutaciones en BRAF, MEK1 o MEK2. Sin embargo, la inmensa mayoría de pacientes descritos con SC tienen mutación en HRAS, y hoy día, el sentir general invita a ceñir los casos de SC a aquellos con mutación en este gen.



Figura 2. A: Síndrome de Noonan por PTPN11. B: Síndrome de LEOPARD por PTPN11. C: Síndrome de Noonan por SOS1, cortesía de la Dra. Barrio. D: Síndrome Cardiofaciocutáneo por BRAF, cortesía del Dr. Pérez-Aytés. E: Síndrome de Noonan por RAF1, cortesía del Dr. Kuburovic.

## Síndrome de LEOPARD

El síndrome LEOPARD (SL) recibe su nombre como acrónimo de sus características clínicas: Lentiginosis múltiple, anomalías del Electrocardiograma, anomalías Oculares como hipertelorismo, estenosis Pulmonar, Anomalías genitales como criptorquidia, Retraso del crecimiento, y sordera (del inglés *Deafness*). El trastorno, muy similar al SN fenotípicamente, se distingue por la presencia de lentiginosis múltiple y manchas café con leche, la mayor frecuencia de MCH frente a la EP (a pesar de la descripción inicial), y un fenotipo más leve en algunas de sus características (dismorfias faciales, talla baja, re-

traso psicomotor). Se han descrito mutaciones en PTPN11 en cerca del 90% de los pacientes con SL, con dos especialmente recurrentes, p.Thr468Met y Tyr279Cys. Más recientemente se ha identificado mutaciones en RAF1, y por último en BRAF. La aparición de la lentiginosis puede retrasarse hasta el final de la infancia y a veces más allá, lo que hace difícil el diagnóstico, y particularmente puede dificultar el diagnóstico diferencial con el SN con lesiones cutáneas, o con la NF o el SNNF<sup>15, 16</sup>. Si bien uno podría caer en la tentación de considerar al SL una variante sin más del SN, la base genética del primero nos permite individualizarlo como una entidad nosológica diferenciada. Es más, a diferencia de las mutaciones descritas en el resto de genes, las mutaciones en PTPN11 descritas en el SL tienen la particularidad de producir (al menos *in vitro*) una pérdida de función, en abierta oposición con el resto, así como con las mutaciones de pacientes SL descritas en RAF1 y BRAF. La explicación a esta divergencia aún no ha llegado, si bien en ella reside parte de la solidez de la división entre ambos síndromes, y posiblemente una clave importante de la patogénesis de los síndromes RAS-MAPK.

Finalmente se han descrito casos de fenotipos parecidos al del SN con anomalías ectodérmicas debidos a mutaciones en SHOC-2. Así mismo, se ha descrito el síndrome de Legius en un subgrupo de pacientes con NF sin mutaciones en NF1 y sin nódulos de Lisch, neurofibromas ni tumores del SNC, que presentan una proporción variable de rasgos fenotípicos del SN, y que se deben a mutaciones en el gen SPRED1.

## Estudio en la población española

En este trabajo se incluyen los resultados del análisis molecular realizado entre enero de 2005 y enero de 2013 en un total de 910 pacientes (559 varones y 351 mujeres) con sospecha de SN ó síndrome neuro-cardio-facio-cutáneo relacionado de 82 hospitales de 11 comunidades. Se trató principalmente de pacientes pediátricos, el 95% eran menores de 20 años ( $8,58 \pm 17,2$ ). Se analizaron 295 familiares en 189 familias. Se encontró mutación en 285 pacientes, 41 de ellos eran casos familiares. En 252 pacientes índice no relacionados que fueron positivos para mutación se disponía de datos clínicos, con referencia explícita al tipo de cardiopatía padecida en 181. Para un número más limitado de 105 pacientes se dispuso de una exhaustiva y detallada descripción fenotípica recogida en una base access diseñada para este propósito (Proyecto FIS Ezquieta *et al* PI061179). En estos pacientes se realizó el estudio de correlación genotipo/fenotipo que se presenta más adelante.

La muestra analizada fue primordialmente sangre anticoagulada con EDTA, aunque en ocasiones muy

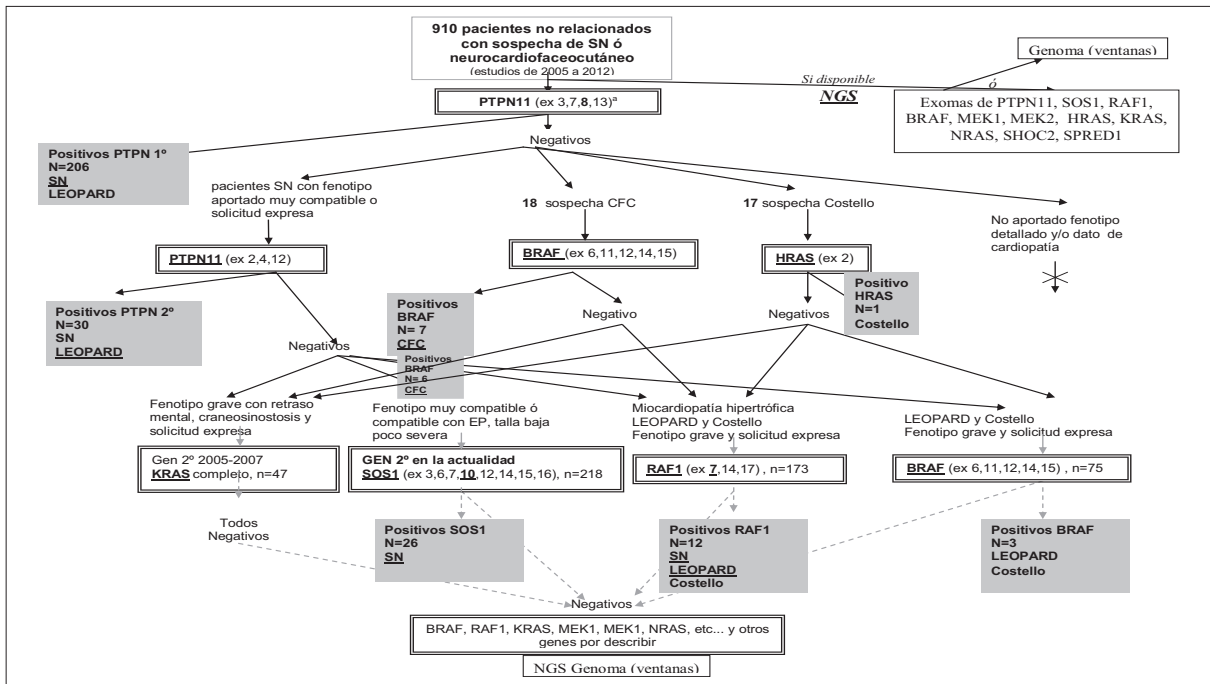


Figura 3. Diagrama de flujo ilustrativo del estudio de genes de la vía RAS-MAPK realizado en los pacientes.

Los genes analizados se enmarcan en doble recuadro y entre paréntesis se indican los exones recurrentes analizados. En recuadro gris se indica el número de pacientes positivos detectados y los síndromes que presentaban, subrayando el más frecuente, entre paréntesis se recoge el número de pacientes de cada síndrome. El estudio primario PTPN11 (4 exones donde se han documentado el 86% de las mutaciones descritas para este locus) se aplicó a todas las muestras y los pacientes para los que no se disponía de fenotipo detallado y/o dato de cardiopatía en el periodo cubierto por el estudio fueron excluidos de análisis adicionales, aunque contabilizados para el cálculo del rendimiento diagnóstico global del análisis molecular. El estudio secundario (3 exones adicionales, con los que en total se cubre el 99% de las mutaciones descritas en la literatura internacional), fue aplicado de forma sistemática a los pacientes con fenotipo disponible con cardiopatía tipo EP ó MCH y en los LEOPARD. Se analizaron otros genes de forma complementaria como se indica en el diagrama. BRAF es el gen analizado en los pacientes CFC y se estudia de forma secundaria en los pacientes Costello, en los LEOPARD negativos para PTPN11 y RAF1. El análisis HRAS fue el estudio inicial en los pacientes Costello y se dirigió a la región del exón 2 que incluye las Gly12 y Gly13 que se encuentran mutadas en el 85-90% de estos pacientes KRAS fue en una primera etapa el segundo gen a analizar en SN, Costello y CFC. Actualmente ha sido desplazado por SOS1 (SN) y RAF1 (pacientes con MCH, LEOPARD y Costello) en nuestros estudios secundarios. KRAS se analiza en pacientes negativos con craneosinostosis y/o fenotipo muy severo que asocian retraso mental. El gen SOS1 aunque fue descrito con posterioridad es actualmente el segundo gen a analizar en los pacientes con sospecha SN, muy especialmente si existe cardiopatía tipo EP y hay una menor afectación de talla. RAF1 es el segundo gen analizado si la cardiopatía es de tipo MCH y en los LEOPARD. El abordaje alternativo apoyado en NGS (*Next Generation Sequencing*) se propone, o bien como estudio primario de caracterización ó como estudio complementario para los pacientes bien caracterizados que han sido negativos para el estudio básico estratificado. Dado que la validación clínica para estos abordajes está por establecer, en un contexto clínico proponemos para el primer planteamiento un abordaje centrado en los grupos de genes con implicación ya establecida (paneles). En el caso del NGS como complemento del estudio estratificado consideramos de elección un abordaje global ó genómico analizado por “ventanas” de genes, para el que obviamente habrá tenido que existir un adecuado consejo genético “preprueba”.

limitadas se analizaron otros tejidos: tejidos renal y hepático de una necropsia de un fallecido a término y 24 muestras prenatales. La secuenciación se realizó de forma bidireccional sobre amplicones obtenidos de los genes PTPN11, SOS1, RAF1, BRAF, HRAS y KRAS siguiendo el diagrama de flujo recogido en la Figura 3.

encontrado asociados a las distintas alteraciones. La serie incluye tanto los pacientes *de novo* como los pacientes índice de las formas familiares detectadas. Estos datos corresponden a los publicados recientemente por nuestro grupo<sup>2</sup>, completados con los casos analizados a lo largo de 2011 y 2012, con 40 nuevos pacientes caracterizados.

En la Tabla 2 se recogen las alteraciones detectadas en 285 pacientes españoles con una distribución de sexos, 165 varones y 120 mujeres, que reflejaba el sesgo mostrado por la muestra original. En la Figura 3 se muestran los síndromes que hemos

La tasa de caracterización obtenida para el estudio PTPN11 fue del 26% (236/910 pacientes). El rendimiento diagnóstico de PTPN11 se incrementa al 48% (204/422) si consideramos únicamente el grupo de pacientes en los que constaba la existencia

Tabla 2. Alteraciones detectadas en genes de la vía RAS-MAPK en pacientes españoles con síndrome de Noonan y otros síndromes neurocardiofaciocutáneos.

Gen	Dominio proteína	Exón	Genotipo <sup>a</sup>	Portadores de la alteración	Distribución de frecuencias <sup>b</sup>	Formas de novo <sup>c</sup>	Formas familiares <sup>c</sup>
PTPN11	Dominio regulador	2	p.Thr42Ala	4	1,7%	4	0
		3	p.Thr52Ile	1	0,4%	0	1
		3	p.Asn58Asp, p.Asn58His, Asn58Lys	6	2,5%	6	0
		3	p.Gly60Ala, p.Gly60Ser	5	2,1%	5	0
		3	p.Asp61Gly, p.Asp61Asn	12	5,1%	12	0
		3	p.Tyr62Asp	4	1,7%	4	0
		3	p.Tyr63Cysd	15	6,4%	12	3
		3	p.Glu69Gln	1	0,4%	1	0
		3	p.Ala72Gly, p.Ala72Ser	11	4,7%	11	0
		3	p.Thr73Ile, p.Thr73Leu	3	1,3%	3	0
		3	p.Glu76Asp	1	0,4%	1	0
		3	p.Gln79Arg	12	5,1%	8	4
		3	p.Asp106Ala	4	1,7%	4	0
	Región puente	4	p.Glu110Lys	1	0,4%	1	0
		4	p.Glu139Asp	9	3,8%	8	1
	Dominio centro activo	7	insCAA(Gln256)e	1	0,4%	0	1
		7	p.Gln256Arg	1	0,4%	1	0
		7	p.Leu261Phe	1	0,4%	1	0
		7	p.Gly268Cys	1	0,4%	1	0
		7	p.Tyr279Cys	9	3,8%	8	1
		7	p.Ile282Val	3	1,3%	3	0
		7	p.Phe285Leu,	5	2,1%	4	1
		8	p.Phe285Cys, p.Phe285Ser	4	1,7%	4	0
		8	p.Asn308Asp, p.Asn308Ser	72	30,5%	66	6
		12	p.Ala461Ser, p.Ala461Thr	3	1,3%	3	0
		12	p.Gly464Ala	1	0,4%	1	0
		12	p.Thr468Met	13	5,5%	12	1
		13	p.Pro491Ser, p.Pro491Thr	5	2,1%	2	3
		13	p.Arg498Trp	1	0,4%	1	0
		13	p.Ser502Ala, p.Ser502Leu	2	0,8%	2	0
		13	p.Gly503Arg	3	1,3%	3	0
		13	p.Met504Val	17	7,2%	16	1
13	p.Gln510Glu, p.Gln510Pro, p.Gln510Arg	5	2,1%	4	1		
				236		212	24

(Continúa)

Tabla 2. (Continúa)

Gen	Dominio proteína	Exón	Genotipo <sup>a</sup>	Portadores de la alteración	Distribución de frecuencias <sup>b</sup>	Formas <i>de novo</i> <sup>c</sup>	Formas familiares <sup>c</sup>
SOS1	Dominio DH	3	p.Trp85Arg <sup>f</sup>	1		20	6
		6	p.Thr266Lys	3			
		6	p.Met269Thr, p.Met269Arg	3			
		7	p.Asp309Tyr	2			
	Dominio union PH-REM	10	p.Trp432Arg	2			
		10	p.Asp433Lys	1			
		10	p.Ile437Thr	2			
		10	p.Arg497Gln	1			
		10	p.Ser548Arg	1			
		10	p.Arg552Ser, p.Arg552Gly, p.Arg552Trp, p.Arg552Thr	6			
		10	c.1330_1332del <sup>g</sup>	1			
		14	p.Lys728Ile	2			
		16	p.Glu846Lys	1			
RAF1	Dominio CR2	7	p.Ser257Leu	7		12	0
		7	p.Ser259Phe	1			
		7	p.Pro261His, p.Pro261Thr	3			
	Dominio activación (CR3)	14	p.Glu478Lys	1			
				12			
BRAF	CRD (CR1)	6	p.Ala246Pro	2		10	0
		6	p.Gln257Arg	4			
	Dominio activador (CR3)	12	p.Leu485Phe	1			
		12	p.Glu501Lys	2			
		14	p.Asn581Asp	1			
				10			
		2	p.Gly12Cys	1		1	
						255	30
<b>TOTALES</b>				285		285	

<sup>a</sup> Las alteraciones detectadas en los pacientes españoles fueron, con excepción de las descritas en notas <sup>e, f, g</sup> mutaciones ya documentadas en pacientes Noonan u otros neurofaciocutáneos en otras poblaciones. No se incluyen las variantes intrónicas ni los polimorfismos descritos en zonas codificantes. En la Figura 3 se indican el o los tipos de síndromes que presentaron los pacientes portadores de las mutaciones de los distintos genes. <sup>b</sup> Frecuencia de las alteraciones en los distintos dominios de la proteína codificada por el gen PTPN11. No se incluyen los porcentajes para el resto de genes dado el número reducido de alelos portadores. <sup>c</sup> Se incluyen como formas *de novo* todos aquellos casos índice con genotipo positivo para los que no se solicitó estudio familiar ó aquellas para las que se analizaron progenitores que resultaron no portadores de la mutación (ver apartado relativo a estudios familiares). Como formas familiares se recogen exclusivamente aquellas en las que la mutación se detectó en alguno de los progenitores; no se contabilizan los casos con genotipo negativo, aunque se hubiera referido herencia familiar fenotípica. <sup>d</sup> Uno de los pacientes que presentó la mutación p.Tyr63Cys mostró una alteración adicional del exón 8, p.Met311Val en cis con la mutación, que cosegregaba en los familiares que presentaban la enfermedad. La variante p.Met311Val no ha sido descrita y, aunque no se ha detectado en 700 cromosomas normales (analizados mediante secuenciación parcial de PTPN11), los estudios *in silico* (SIFT, Mutpred) sugieren que se trata únicamente de un polimorfismo. <sup>e</sup> En una forma familiar se caracterizó una alteración nueva en PTPN11 que cosegregaba con el fenotipo e implicaba la inserción en fase del triplete CAA en el exón 7. Este triplete codificante del aminoácido glutamina (Gln) se localiza adyacente al residuo Gln256 (ins CAA, Gln256) y no se ha detectado en los 700 cromosomas normales analizados. <sup>f</sup> Una paciente *de novo* mostró la alteración no descrita p.Trp85Arg (c.925 G>T), que ha sido descartada en 200 cromosomas normales. <sup>g</sup> Un paciente *de novo* presentó la alteración de SOS1 c.1330\_1332del. Esta alteración no descrita se ha descartado en 1.000 cromosomas normales mediante cribado HRM (*High Resolution Melting*) y se encuentra en preparación el manuscrito que la describe.

Tabla 3. Pacientes y familiares cuyo diagnóstico molecular permitió reorientar/realizar el diagnóstico clínico (datos recogidos en Ezquieta *et al*).

Caso <sup>a</sup>	Familia	Casos índice/ Familiares	Diagnóstico inicial	Genotipo	Diagnóstico final
		Indices			
1	1	Indice	Noonan	PTPN11-p.Thr-468Met	LEOPARD
2	2	Indice	NF tipo I con MCH	PTPN11-p.Thr-468Met	LEOPARD
3	3	Indice	NF tipo I con MCH	PTPN11-p.Thr-468Met	LEOPARD
4	4	Indice	NF tipo I con MCH	PTPN11-p.Thr-468Met	LEOPARD
5	5	Indice	NF tipo I con MCH	PTPN11-p.Thr-468Met	LEOPARD
6	6	Indice	Costello <sup>c</sup>	RAF1-p.Ser257Leu	Noonan con MCH
7	7	Indice	Noonan	BRAF-p.GlnQ257Arg	CFC
8	8	Indice	Cardiopatía, no diagnóstico sindrómico	BRAF-p.GlnQ257Arg	LEOPARD
9	9	Indice	Costelloc	RAF1-p.Ser257Leu	Noonan con MCH
		Familiares			
10	10	Madre	LEOPARD familiar	PTPN11-normal	No afecta
11	10	Hijo afecto (índice)	LEOPARD familiar	PTPN11-p.Asn308Asp	Noonan de novo
12	11	Madre	Talla baja y facies sugestiva no diagnosticada	PTPN11-p.Tyr63Cys	Noonan
13	11	Hijo <sup>b</sup> (índice)	Hidrops foetalis, muerte neonatal	PTPN11-p.Tyr63Cys	Noonan
14	12	Madre	Talla baja, Sospecha Turner	PTPN11-p.Asn308Asp	Noonan
15	13	Padre	Criptorquidismo		Noonan
16	14	Padre	Criptorquidismo bilateral		Noonan
17	15	Madre	Sospecha Noonan	PTPN11-normal	No afecta
18 a 26			No consulta, actualmente en evaluación clínica	7 PTPN+ y 2 SOS1+	Noonan

CFC, síndrome cardio-facio-cutáneo; MCH, miocardiopatía hipertrófica. <sup>a</sup> Solo se incluyen aquí los casos en que se documentó el cambio en el diagnóstico clínico, la selección puede por tanto no ser exhaustiva. <sup>b</sup> El estudio molecular se realizó sobre necropsia, tejido renal y hepático. <sup>c</sup> Dos pacientes no relacionados de distintos hospitales con sospecha de síndrome de Costello mostraron la mutación RAF1.

de cardiopatía. Sólo 10 pacientes PTPN11 positivos no presentaban cardiopatía 7% (12/170).

La distribución de la frecuencia de mutaciones en PTPN11 fue similar a la descrita en estudios previos<sup>17,18</sup>, con un 34% (79 casos) en zona reguladora, 4% en zona puente (10 casos) y 62% (147 casos) en zona dominio fosfatasa. Se detectaron formas *de novo* y familiares en ambas zonas, reguladora y centro activo (Tabla 2). La alteración más recurrente, p.Asn308Asp (n=61), se localiza en el dominio

fosfatasa, aunque también se detectó el cambio p.Asn308Ser (n=11). Las mutaciones de la región reguladora del centro activo constituyen el segundo bloque mayoritario y afectan a múltiples aminoácidos primordialmente localizados en el exón 3.

Los pacientes LEOPARD presentaron predominantemente mutaciones en PTPN11<sup>16</sup>, siendo recurrente la p.Thr468Met que se detectó en algunos pacientes que habían sido diagnosticados de NF<sup>15</sup> y también en pacientes con diagnóstico Noonan que



posteriormente desarrollaron el fenotipo completo LEOPARD (Tabla 3).

El estudio del gen KRAS fue inicialmente planteado como primera alternativa en los casos PTPN11 negativos con sospecha clínica firme, aunque no se caracterizaron alteraciones en ningún caso. Actualmente se aplica como estudio de tercer o cuarto nivel para fenotipos severos que asocian retraso mental y también cuando se asocia craneosinostosis<sup>19</sup>.

El análisis de SOS1 es en la actualidad el segundo gen analizado en Noonan. En el periodo recogido en este estudio se han caracterizado 26 pacientes, la gran mayoría con diagnóstico de SN que asocia cardiopatía, primordialmente EP pero también ocasionalmente MCH. En dos pacientes, el fenotipo con alteraciones dermatológicas había llevado a sospechar un CFC ó un LEOPARD, respectivamente. El exón 10 mostró una alta recurrencia, concretamente la alteración del residuo Arginina 552 se detectó en seis pacientes. En cuatro de las 26 familias con mutación en SOS1 se detectaron familiares afectos.

El estudio del resto de genes que hemos tenido ocasión de analizar, RAF1, BRAF, KRAS y HRAS, se ha aplicado a grupos más seleccionados de pacientes por su asociación más expresa con determinados signos y/o fenotipos clínicos, como RAF1 en MCH ó BRAF en rasgos cardiorfaciocutáneos (ver Figura 3 y apartado “relación genotipo/fenotipo”).

Doce pacientes en esta serie presentaron mutación en RAF1, siendo la alteración más recurrente (7 casos) la p.Ser257Leu. Cabe reseñar que la mutación detectada fuera de este exón, la p.Asp478Lys del exón 14, es la única en esta serie que había sido descrita en tumores esporádicos como mutación somática *de novo*. Se confirmó que los padres asintomáticos no presentaban la alteración por lo que la mutación se había producido *de novo* en línea germinal. En dos pacientes no relacionados y procedentes de distintos Hospitales con sospecha de Costello se detectó la mutación p.Ser257Leu del gen RAF1 (Tabla 3).

Se detectaron 10 pacientes BRAF positivos. En cinco de ellos el diagnóstico clínico original de CFC fue confirmado, en otros cuatro el diagnóstico fue reorientado por el hallazgo molecular (Tabla 3). El estudio de HRAS fue aplicado en los pacientes con sospecha de síndrome de Costello y descartó en 16/17 analizados las alteraciones recurrentes. Solo uno de los pacientes de esta serie con esta sospecha diagnóstica presentó la mutación recurrente HRAS, p.Gly12Cys. En tres pacientes con sospecha de Costello se caracterizaron mutaciones en alguno de los otros genes analizados (Figura 3, Tabla 3).

El rendimiento diagnóstico global (pacientes positivos/pacientes analizados) fue del 31,3%, similar al descrito para otras series internacionales carentes de una rigurosa y homogénea selección de pacientes. Este rendimiento fue muy heterogéneo aún considerando exclusivamente los 18 hospitales con un mayor número de solicitudes (no inferior a nueve pacientes), cuyo rendimiento medio fue del 34%. Se observaron grandes diferencias entre los distintos Hospitales solicitantes, variando desde un 8% (2/25) hasta un 53% (17/32). Para alguno de los facultativos solicitantes se obtuvo un rendimiento diagnóstico del estudio molecular del 66,6% (10/15,  $p=0,01$ ) lo que indica que el abordaje molecular planteado es adecuado y que debe mejorarse la forma de establecer la sospecha diagnóstica en nuestro medio.

En los pacientes con cardiopatía tipo EP o MCH el rendimiento diagnóstico se ha visto muy favorecido, 60,6% frente al 31,3% global. Se observó un menor rendimiento diagnóstico en el grupo de pacientes para los que no se disponía de datos fenotípicos, 18% vs 31% ( $p=0,0002$ ).

El perfil genotípico observado no difiere del descrito en otras poblaciones: PTPN11 es el gen mayoritario y SOS1 ocupa la segunda posición. La asociación de MCH hace primordial el estudio de RAF1 en los pacientes PTPN11 negativos y cuando hay rasgos CFC, el análisis primario de BRAF. Sin embargo, no debe descartarse el análisis complementario de estos genes en pacientes con sospecha de otros síndromes RAS-MAPK; de hecho en dos casos no relacionados con sospecha de Costello, generalmente asociado a HRAS, se detectó una misma mutación de RAF1. El diagnóstico diferencial se vio facilitado muy especialmente en el periodo neonatal y en el LEOPARD (Tabla 3).

El estudio estratificado planteado es acorde con las recomendaciones actuales de Romano *et al*<sup>20</sup> que proponen un abordaje estratificado basado en el fenotipo frente al genotipado mediante “arrays”. El abordaje alternativo apoyado en NGS (*Next Generation Sequencing*) que proponemos en la Figura 3, bien como estudio primario de caracterización ó como estudio complementario para los pacientes bien caracterizados que han sido negativos para el estudio básico estratificado, en caso de encontrarse disponible y ser económicamente adecuado. No debemos olvidar que debería quedar garantizada la validación clínica de los hallazgos ya que en este tipo de abordajes el potencial de detección obliga a disponer de la capacidad de interpretación de los resultados ya que muchas de las variantes que puedan ser documentadas no serán responsables del fenotipo en cuestión que se quiere diagnosticar. Debe garantizarse un consejo genético pre-prueba acorde con el abordaje que se va a aplicar y obvia-

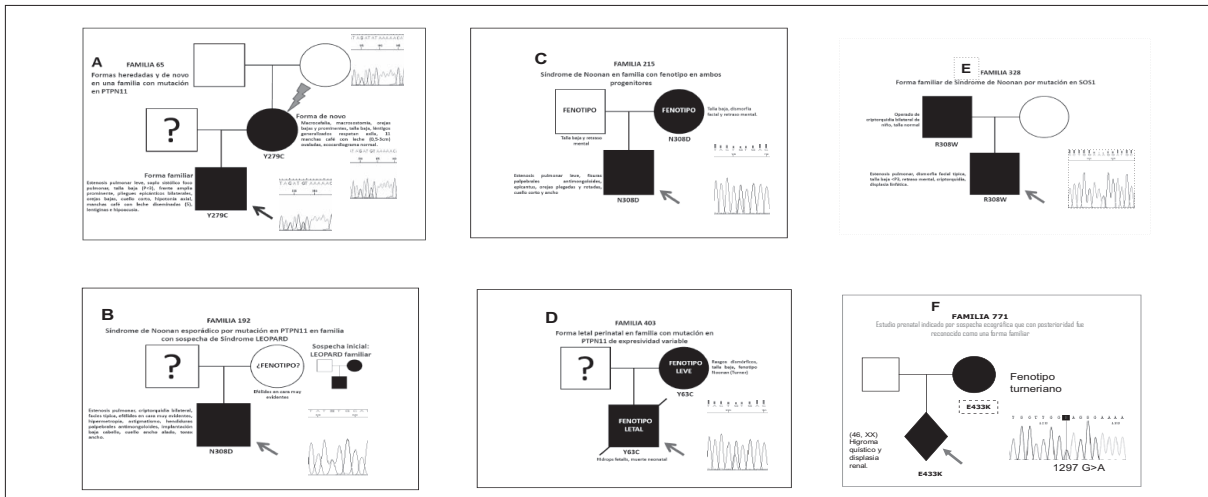


Figura 4. Algunos ejemplos ilustrativos de árboles familiares de los estudios Noonan realizados. A) Formas heredadas y *de novo* en una familia con mutación en PTPN11. El caso índice, un varón de 9 años, presenta un fenotipo típico de SL con cardiopatía, talla baja, dismorfia facial, manchas café con 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*. B) Síndrome de Noonan esporádico por mutación en PTPN11 en familia con sospecha de Síndrome LEOPARD. Se trata en este 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, EP 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*. C) Síndrome de Noonan en familia con fenotipo en ambos progenitores. Se trata de un varón con cardiopatía y facies sugestiva 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. D) 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 y rasgos dismórficos) y alteraciones ecográficas (*hidrops 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. E) 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 EP, dismorfia facial típica y criptorquidia. Su padre refiere antecedentes de criptorquidia, intervenida en su infancia, y talla baja. El estudio de PTPN11 no desveló ninguna alteración. La presencia de cardiopatía y criptorquidia motivaron el posterior análisis del gen SOS1, que reveló la presencia de la mutación p.R308W en ambos individuos. F) Estudio prenatal indicado por sospecha ecográfica que con posterioridad fue reconocido como una forma familiar. La madre había mostrado fenotipo (interpretado como “turneriano”) y fue analizada molecularmente como consecuencia de la sospecha prenatal. Se demostró que presentaba la mutación E433K de SOS1 que a continuación fue analizada y documentada también en la muestra prenatal.

mente el consentimiento informado para un estudio cuyo potencial de caracterización rebasa el contexto clínico en que se plantea. Un abordaje limitado a los paneles de genes cuya implicación ya ha sido demostrada podría ser un planteamiento adecuado en este primer tipo de estudio NGS propuesto. En el segundo, como herramienta complementaria

para la caracterización molecular de los pacientes que han sido negativos en el estudio básico estratificado, un abordaje de tipo genómico podría ser más adecuado. En este último supuesto deberán cuidarse en extremo los aspectos mencionados de consejo pre-prueba genética y consentimiento, ya que la validación clínica tiene todavía un largo ca-

mino que recorrer, por lo que en este caso el planteamiento diagnóstico sería más “traslacional” que de tipo asistencial.

Los factores que han favorecido la mayor tasa de caracterización genotípica en este estudio estratificado han sido, aparte de la mera aportación de datos clínicos, la evaluación del paciente por dismorfólogos expertos y la existencia de cardiopatía. Los criterios clínicos de Burgt<sup>21</sup>, ampliamente aceptados y utilizados, otorgan un gran protagonismo a la facies característica como clave diagnóstica. Nuestros datos en pacientes con genotipo positivo dan relevancia a la existencia y el tipo de cardiopatía que, quizás al ser un criterio más objetivo y uniforme, ha sido en nuestro medio un dato que ha orientado con más especificidad la sospecha diagnóstica.

Estamos trabajando en la optimización de otros marcadores que puedan contribuir a objetivar la sospecha, como la morfometría en fotos faciales<sup>22</sup> o la detección de la sobreexpresión de mensajeros de la vía RAS-MAPK<sup>23</sup>.

### Estudios familiares

Se detectaron 30 formas familiares. Las formas familiares sólo se detectaron en pacientes que presentaban mutaciones en PTPN11 (n=35) y en SOS1 (n=6) (ver Tabla 2). algunas de ellas ya han sido descritas en esta revista<sup>24</sup>. Encontramos 41 casos familiares en estas familias, en algunos casos no se había establecido previamente el diagnóstico clínico (Tabla 3, familiares). En la Figura 4 se muestra una selección de árboles familiares con casos de interés. Un 86% (254/295) de los estudios familiares solicitados fueron negativos. Los estudios se solicitaron también con la finalidad de confirmar que la mutación se había producido *de novo*.

La herencia fue más frecuentemente materna. En dos pacientes, que ilustran la distinta expresividad fenotípica del síndrome, la sospecha diagnóstica en la madre fue consecuencia de la sospecha pre ó perinatal en el hijo. En ambos casos la confirmación molecular en la madre precedió al estudio del índice. En un caso se trató de una sospecha prenatal por translucencia nucal aumentada (ver más adelante el apartado dedicado a la sospecha prenatal del SN), el segundo caso fue un *hidrops foetalis* que fue *exitus*. En una forma familiar (madre e hijo portadores) el estudio de los abuelos pudo documentar que la mutación se había producido *de novo* en esta generación previa. Otro ejemplo curioso es el de una “aparente” forma familiar de LEOPARD, en el que el genotipado constató que sólo el hijo (facies típica, EP, talla baja) presentaba mutación en PTPN11 (p.Asn308Asp) mientras que la madre, con genotipo negativo, sólo compartía la abundancia de efélides (ver Tabla 3).

La cardiopatía, que como hemos visto es un hallazgo casi constante en los casos índice portadores de mutación, se encontraba muy infrecuentemente diagnosticada y/o valorada en los progenitores que presentaron la alteración. En cuatro casos existían signos clínicos compatibles que no habían llevado al diagnóstico (talla baja, criptorquidia) y en nueve casos no había existido consulta, diagnóstico ó evaluación previa al hallazgo molecular. En 11 de los casos familiares positivos no se había informado de fenotipo en el pariente afecto. Solo en cuatro de los 24 adultos positivos detectados en el estudio familiar, la cardiopatía se había diagnosticado previamente.

El diagnóstico molecular ha permitido descartar el síndrome en algunos familiares que compartían signos pero no padecían la enfermedad y se pudo confirmar *postmortem* una forma familiar. No menos importante es que se detectaron familiares afectados con cardiopatía que no habían sido previamente reconocidos (Tabla 3).

### Correlación genotipo-fenotipo

A continuación presentamos los datos de correlación entre genotipo y fenotipo obtenidos del análisis de 105 pacientes con mutaciones en genes de la vía RAS-MAPK en los que contábamos con una descripción clínica completa (enviado para publicación). Se trata de un abordaje preliminar ya que el estudio completo de correlación de un total de más de 130 pacientes se encuentra en desarrollo.

En total se analizaron 97 casos índices (92,4%) y 8 casos familiares. Se correlacionaron datos de 90 pacientes con SN, 11 con SL y 4 con CFC. La distribución por sexos del total de pacientes mostró un discreto predominio de varones (63,8% frente a 36,2), que se mantenía en los distintos genes estudiados (62,2% frente a 37,8% en PTPN11, 66,7/33,3 % en SOS1, 57,1/42,9% en RAF1) sin alcanzar significación estadística en ninguno de ellos.

La distribución de los genes mutados por cada síndrome fue la siguiente: en SN PTPN11 73 pacientes (81,1%), seguido de SOS1 con 12 pacientes (13,33%) y 5 pacientes por RAF1 (5,55%). En SL PTPN11 9 pacientes (81,81%), seguido de RAF1 con 2 pacientes (18%). El 100% de pacientes con CFC tenían mutación en BRAF.

En los pacientes con mutación en PTPN11 (73 pacientes con SN, 9 con SL) se encontró una mayor frecuencia de EP (64,6% frente a 56%, p=0,067) y menor de MCH (12,6% frente a 43%, p=0,005). La talla era más baja en los PTPN11 positivos que en los negativos (-2,65 SDS frente a -2,27 SDS, p=0,07). Por último, se encontraron convulsiones

más frecuentemente en pacientes PTPN11 negativos que en aquellos positivos ( $p=0,046$ ).

Los 12 pacientes con mutación en SOS1 tenían SN. Su talla era significativamente más alta (-1,14 frente a -2,6,  $p < 0,001$ ), y ninguno de ellos tenía retraso psicomotor ( $p=0,035$ ). En el grupo SOS1 positivo la cardiopatía más frecuente fue la EP (83% frente a un 65% en PTPN11 positivos y un 14% en RAF1 positivos,  $p=0,067$ ).

En cuanto a los 7 pacientes con mutación en RAF1 (5 con SN y 2 con SL), la talla fue significativamente más baja que en los negativos (-5,24 frente a -2,45,  $p=0,018$ ). Estos pacientes mostraron una clara asociación con MCH ( $p < 0,001$ ) y con retraso psicomotor (42,9% frente a 23,4%,  $p=0,009$ ). También en estos pacientes se encontró una mayor asociación con la presencia de manchas café con leche (42,9% frente a 28%,  $p=0,018$ ). Si bien 2 de los 7 pacientes tenían el diagnóstico de SL, que asocia la presencia de manchas café con leche y lentiginosis múltiple, esta última característica no se asoció de forma significativa con los pacientes RAF1 positivos (28,6% frente a 10,2%,  $p=0,18$ ).

En los 4 pacientes con mutación en BRAF no se realizó estudio estadístico por lo limitado de la muestra. En ellos se pudo observar una fuerte asociación a talla baja (todos ellos con talla menor de -2 DE), hipocausia (2 de 4), MCH, y retraso psicomotor.

Existe una importante correlación clínico/molecular en los estudios monogénicos que actualmente se aplican, aunque evidentemente no queda explicada toda la variabilidad expresiva de estos síndromes. La posibilidad de que exista una cierta modulación por variantes en otros genes de la vía RAS es una posibilidad, aunque el hecho de que todavía no se haya acumulado evidencia en este sentido puede estar reflejando que no sea éste el mecanismo mayoritario. Otra posibilidad que planteamos en un terreno todavía absolutamente especulativo es que la heterogeneidad clínica pudiera estar sustentada por efectos de mosaicismos locales, en los que una pérdida de función mono o bialélica de alguno o algunos de los genes relacionados, y los efectos de dosis de ella derivados, pudieran traducirse en una expresividad clínica variable.

### Estudios prenatales y consejo genético en el síndrome de Noonan

Algunos autores sugieren que, en ausencia de alteraciones en el cariotipo, debe considerarse el SN en el diagnóstico diferencial de fetos con translucencia nucal (TN) aumentada, especialmente cuando se encuentra asociada a defectos cardíacos, polihidramnios y/o efusiones múltiples.

En el SN, el aumento de la TN o la aparición de higroma quístico *in utero* sería consecuencia de un desarrollo anómalo del sistema linfático (con displasia, hipoplasia o aplasia de los vasos linfáticos) típico de este síndrome, o por la cardiopatía que aparece en algunos casos de SN, si bien sólo un pequeño porcentaje de estos se diagnostican prenatalmente.

Hay que resaltar que los hallazgos ecográficos antes mencionados no son específicos de SN y pueden encontrarse en fetos con otros síndromes e incluso en fetos que posteriormente se desarrollan con normalidad. Datos recogidos en diferentes estudios de cribado prenatal indican que un 4,4% de las gestaciones en las que aparece un aumento de la TN y el cariotipo es normal, se deben a defectos del desarrollo o síndromes genéticos. En aproximadamente el 50% de estos casos no se han identificado los genes responsables de la enfermedad<sup>25</sup>.

Actualmente no existe ningún protocolo de priorización de pruebas diagnósticas moleculares ante el hallazgo de aumentos en la TN en el primer trimestre. Recientemente se han publicado diversos estudios que intentan establecer el valor diagnóstico y pronóstico de determinados parámetros ecográficos prenatales en fetos con SN, estudiando la prevalencia de anomalías detectadas prenatalmente en el SN y su correlación con el genotipo y el fenotipo post-natal.

En base a estos estudios<sup>26, 27</sup>, el estudio molecular prenatal de SN podría estar indicado en los siguientes contextos:

- Presencia de características ecográficas sugestivas de síndrome de Noonan, como son el aumento translucencia nucal (TN) o el higroma quístico, en combinación con uno o más de los siguientes hallazgos: polihidramnios, ascites, derrame pleural, hydrops, defectos cardíacos congénitos, anormalidades renales o rasgos faciales sugestivos, en ausencia de defectos cromosómicos. Es muy importante, en estos casos, la evaluación de los padres buscando signos sugestivos de SN.
- Fetos con o sin anomalías ecográficas en los que algún familiar de primer grado estuviera diagnosticado previamente de SN.

En ambos casos se recomienda la realización de una ecografía en la semana 12-14, que se repetiría en la semana 20 y en el tercer trimestre. También estaría indicada la realización de un ecocardiograma fetal en la semana 18-20 de embarazo.

De cualquier manera, debe seguir perfilándose la indicación del estudio prenatal para la sospecha

ecográfica Noonan y protocolizarse el abordaje molecular a aplicar<sup>28, 29</sup>, como comentamos más adelante.

En el Laboratorio de Diagnóstico Molecular del H.G.U. Gregorio Marañón, el cribado molecular prenatal de SN se realiza en la actualidad a partir de DNA extraído de vellosidad corial o amniocitos, por secuenciación parcial de los genes PTPN11, SOS1, RAF1 y BRAF, analizando más del 90% de las mutaciones descritas en SN y alrededor del 85% de todas las identificadas en individuos con SN y antecedentes prenatales de anomalías ecográficas. Se han realizado hasta el momento 24 estudios prenatales, 14 de ellos eran casos *de novo* para descartar mosaïcismo germinal (ver más abajo), y diez solicitados por sospecha ecográfica. De estos últimos, uno de los estudios (en el que se identificó una mutación en el gen SOS1) resultó finalmente ser una forma familiar de transmisión materna (Figura 4).

El estudio molecular prenatal de Noonan tiene propiedades diagnósticas y posibles propiedades pronósticas que le pueden ser de utilidad al clínico en el consejo genético, en determinar las opciones de manejo del paciente y en la optimización de los cuidados perinatales. Por otra parte, hay que puntualizar que un resultado negativo en el cribado molecular prenatal de Noonan no excluye su diagnóstico posterior, aun siendo este realizado mediante *arrays* comerciales (Gene Dx, CGC y TessArae) los cuales, desafortunadamente, no precisan el porcentaje de cobertura de análisis para las mutaciones responsables del SN.

Todas las limitaciones y ventajas que hemos mencionado más arriba para las distintas opciones disponibles de diagnóstico molecular (secuenciación estratificada directa de regiones génicas documentadas en su implicación clínica en el síndrome, *arrays* de genotipado ó la secuenciación masiva) aplicadas en sospechas diagnósticas en pacientes adquieren una mayor relevancia en el contexto clínico del diagnóstico prenatal ya que únicamente las alteraciones con contrastado efecto fenotípico (clínico) podrían permitir un consejo genético depurado para una toma de decisiones acorde y debidamente documentada.

En cuanto al consejo genético, cuando una pareja ya ha tenido un hijo con SN, la probabilidad de recurrencia en un segundo descendiente dependerá del estatus de los padres. Si alguno de ellos es afecto, esta probabilidad será del 50%. Si ambos padres son normales, el riesgo será similar al de la población general (<1%), aunque podría ser algo superior si se considera la posibilidad de que la mutación *de novo* haya ocurrido en la línea germinal y exista un mosaïcismo de gametos<sup>30</sup>.

Ante el riesgo de transmisión del síndrome, la pareja debería ser informada de la posibilidad de realizar diagnóstico preimplantacional. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayoría de los niños con SN crecen y se desarrollan sin problemas mayores; siempre que se realice un seguimiento orientado a los problemas de alimentación durante la niñez temprana, la evaluación de la función cardíaca y del crecimiento y desarrollo motor posteriormente.

## Conclusiones

La base molecular del SN es paradigmática de cómo la investigación básica puede ayudar a delimitar las entidades nosológicas, y cómo los datos clínicos deben orientar los estudios moleculares y pueden contribuir a esclarecer el significado de los hallazgos genéticos; en definitiva, de la forma afirmativa del título que ha recibido esta mesa "De la clínica al gen y del gen a la clínica".

El análisis de los datos obtenidos por los clínicos remitentes de más de 900 pacientes ha aportado una información valiosísima, y nos ha ayudado a depurar nuestro enfoque a la hora de encarar el estudio de estos pacientes. El desarrollo de herramientas para mejorar la caracterización fenotípica como las bases de datos y el análisis morfométrico de fotografías contribuye a conocer mejor la correlación entre genotipo y fenotipo en estos síndromes.

Nunca se insistirá demasiado en la pertinencia de hacer un apropiado enfoque diagnóstico basado en la valoración clínica del paciente antes de abordar el correspondiente estudio genético. Aunque la era de la secuenciación masiva (NGS, *Next-Generation Sequencing*) ya ha llegado, y con ella la posibilidad de conocer de una forma rápida todas las variantes/alteraciones del genoma individual, la interpretación correcta del efecto de las mismas y de su interacción sobre el fenotipo del paciente requerirá de la validación clínica, lo que nunca será posible sin la depurada valoración clínica a la que nos referimos. Los hallazgos moleculares en las entidades monogénicas pueden confirmar nuestra sospecha diagnóstica, aportarnos información adicional de carácter pronóstico, o reorientar nuestra sospecha hacia otra entidad relacionada, dado el carácter evolutivo de estas enfermedades. Sin embargo, salvo en los casos familiares de índices positivos y el caso aislado del síndrome de Costello, los estudios moleculares no nos permiten descartar un síndrome, ya que aún hay pacientes con síndromes neurocardio-facio-cutáneos para los que se desconoce una causa genética. El avance en el conocimiento de la regulación fisiológica y patológica de la vía RAS-MAPK es hoy por hoy el objetivo fundamental de la investigación para esclarecer la causa genética de esos casos, y la esperanza para encontrar nuevas dianas terapéuticas para estos pacientes.

## Bibliografía

1. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H *et al*. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2001;29:465–8.
2. Ezquieta B, Santomé JL, Carcavilla A, Guillén-Navarro E, Pérez-Aytés A, Sánchez del Pozo J *et al*. Alterations in RAS-MAPK genes in 200 Spanish patients with Noonan and other neuro-cardio-faciocutaneous syndromes. Genotype and cardiopathy. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65:447-55.
3. Noonan JA. Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease. *Am J Dis Child*. 1968;116:373-80.
4. 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 1;53(2):187-91.
5. Bastida P, MD, García-Miñaur S, Ezquieta B, Dapena JL, Sanchez de Toledo J. Myeloproliferative Disorder in Noonan Syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011;33:e43-5.
6. Schubbert, S., Zenker, M., Rowe, S.L., Boll, S., Klein, C., Bollag, G., van der Burgt, I., Musante, L., Kalscheuer, V., Wehner, LE *et al*. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2006;38:331–6.
7. Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R *et al* Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2007;39:1013-7.
8. Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, *et al* Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat*. 2009;30:695-702.
9. Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C, Horn D *et al*. A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2010;42:27-9.
10. 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;39:70-4.
11. Zenker M. Genetic and Pathogenetic Aspects of Noonan Syndrome and Related Disorders. *Horm Res* 2009;72(suppl 2):57–63.
12. Hart, T. C., Zhang, Y., Gorry, M. C., Hart, P. S., Cooper, M., Marazita, M. L *et al*. A mutation in the SOS1 gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1. *Am. J. Hum. Genet*. 2002; 70: 943-54.
13. Sobreira, N. L. M., Cirulli, E. T., Avramopoulos, D., Wohler, E., Oswald, G. L., Stevens, *et al*. Whole-genome sequencing of a single proband together with linkage analysis identifies a mendelian disease gene. *PLoS Genet*. 2010; 6: e1000991.
14. Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y *et al*. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet*. 2005;37:1038-40.
15. 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;170:1069-74.
16. Carcavilla A, Santomé JL, Pinto I, Sánchez-Pozo J, Guillén-Navarro E, Martín-Frías M, Lapunzina P, Ezquieta. LEOPARD Syndrome: A Variant of Noonan Syndrome Strongly Associated With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol*. 2013 Jan 10.
17. 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;70:1555–63.
18. Zenker M, Buheitel G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W *et al*. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr* 2004;144:368-74.
19. Kratz CP, Zampino G, Kriek M, Kant SG, Leoni C, Pantaleoni F, Oudesluys-Murphy AM, Di Rocco C, Kloska SP, Tartaglia M, Zenker M. Craniosynostosis in patients with Noonan syndrome caused by germline KRAS mutations. *Am J Med Genet A*. 2009 May;149A(5):1036-40.
20. Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, *et al*. Noonan Syndrome: Clinical Features, Diagnosis, and Management Guidelines. *Pediatrics* 2010;126:746-59.
21. van der Burgt I. Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;14:2–4.
22. Carcavilla A, Reig S, Santomé L, Guillén-Navarro E, Lapunzina P, Lopez Siguero JP *et al* Morphometric análisis of facial photographs as a diagnostic tool in Noonan syndrome [abstract]. *Horm Res Paediatr*. 10;74(suppl3):106.

23. Santomé JL, Carcavilla A, Sanchez A, Valiente L, Simon A, Ezquieta B. Molecular diagnosis in Noonan Syndrome: experience recorded and new insights [abstract]. *Horm Res Paediatr*. 2011; 76(suppl2):104.
24. Santomé Collazo JL, Carcavilla Urquí A, Muñoz Pacheco R, Ezquieta Zubicaray B. Estudio molecular de las formas familiares del síndrome de Noonan. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2012;3(1):37-46. <http://dx.doi.org/10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2012.Mar.81>
25. Bilardo CM, Timmerman E, Pajkrt E, van Maarle M. Increased nuchal translucency in euploid fetuses--What should we be telling the parents? *Prenat Diagn* 2010; 30: 93-102.
26. Pergament E, Alamillo C, Sak K, Fiddler M. Genetic assessment following increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenat Diagn* 2011; 31: 307-10.
27. Lee KA, Williams B, Roza K, Ferguson H, David K, Eddleman K, *et al*. PTPN11 analysis for the prenatal diagnosis of Noonan syndrome in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Clin Genet* 2009; 75: 190-4.
28. Gaudineau A, Doray B, Schaefer E, Sananès N, Fritz G, Kohler M, *et al*. Postnatal phenotype according to prenatal ultrasound features of Noonan syndrome: a retrospective study of 28 cases. *Prenat Diagn*. 2013; 33: 238-41.
29. Alamillo CM, Fiddler M, Pergament E. Increased nuchal translucency in the presence of normal chromosomes: what's next? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2012; 24:102-8.
30. 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;152A(11):2850-3.