

Artículo original

# Alteraciones de los genes de la vía RAS-MAPK en 200 pacientes españoles con síndrome de Noonan y otros síndromes neurocardiofaciocutáneos. Genotipo y cardiopatía

Begoña Ezquieta<sup>a,\*</sup>, José L. Santomé<sup>a</sup>, Atilano Carcavilla<sup>a,b</sup>, Encarna Guillén-Navarro<sup>c</sup>, Antonio Pérez-Aytés<sup>d</sup>, Jaime Sánchez del Pozo<sup>e</sup>, Sixto García-Miñaur<sup>f</sup>, Emilia Castillo<sup>g</sup>, Milagros Alonso<sup>h</sup>, Teresa Vendrell<sup>i</sup>, Alfredo Santana<sup>j</sup>, Enrique Maroto<sup>k</sup> y Liliana Galbis<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, España

<sup>b</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, España

<sup>c</sup>Servicio de Genética, Hospital Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, España

<sup>d</sup>Servicio de Dismorfología, Hospital La Fe, Valencia, España

<sup>e</sup>Servicio de Pediatría, Hospital 12 de Octubre, Madrid, España

<sup>f</sup>Servicio de Genética, Hospital La Paz, Madrid, España

<sup>g</sup>Servicio de Genética, Hospital Carlos Haya, Málaga, España

<sup>h</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

<sup>i</sup>Servicio de Genética, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España

<sup>j</sup>Servicio de Genética, Hospital Materno Insular de Gran Canaria, Las Palmas, España

<sup>k</sup>Servicio de Cardiología Pediátrica, Hospital Infantil, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

Historia del artículo:

Recibido el 11 de julio de 2011

Aceptado el 14 de diciembre de 2011

On-line el 31 de marzo de 2012

Palabras clave:

Estenosis pulmonar

Miocardopatía hipertrófica

Mutación génica

Genes RAS-MAPK

RESUMEN

**Introducción y objetivos:** La caracterización molecular de cardiopatías incluye una entidad congénita no infrecuente, el síndrome de Noonan. Presentamos el estudio de seis genes de la vía RAS-MAPK en pacientes españoles: perfil genotípico, impacto de la cardiopatía y expresividad clínica.

**Métodos:** Compusieron la población en estudio 643 pacientes (y 182 familiares) diagnosticados por dismorfólogos, cardiólogos y endocrinopediatras de 74 hospitales (11 comunidades). Estudio primario de *PTPN11* y complementario de *SOS1*, *RAF1*, *BRAF*, *KRAS* y *HRAS*, estratificado y orientado por signos clínicos, mediante secuenciación de exones recurrentes (un 80-95% de mutaciones descritas).

**Resultados:** Se documentó mutación en 230 pacientes (91 mujeres, 139 varones) de 200 familias (31%), 172 *PTPN11* +, 14 *SOS1* +, 9 *RAF1* + y 5 *BRAF* +, con referencia explícita a la cardiopatía padecida en 156 casos índice; 103 presentaban estenosis de la válvula pulmonar; 12, estenosis de la válvula pulmonar y miocardopatía hipertrófica; 18, miocardopatía hipertrófica y 14, otra cardiopatía; en sólo 9 casos se encontraba ausente. En 23/30 familiares positivos no había o no constaba cardiopatía. El rendimiento diagnóstico fue superior ( $p = 0,016$ ) para las muestras de algunos centros (53%; 14/32), y alcanzó el 64% (9/14;  $p = 0,019$ ) en profesionales concretos. El rendimiento cayó al 18% en los pacientes sin datos clínicos facilitados. El dato genotípico reorientó el diagnóstico clínico en 26 pacientes.

**Conclusiones:** El 94% de los pacientes portadores de mutación presentaban cardiopatía, el 79% estenosis de la válvula pulmonar y el 12% miocardopatía hipertrófica. En el 76% de los familiares positivos con rasgos clínicos compatibles, no se había documentado la cardiopatía. El estudio molecular es una herramienta útil en estos síndromes, aunque debe progresarse en la objetivación del diagnóstico clínico. © 2011 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Alterations in RAS-MAPK Genes in 200 Spanish Patients With Noonan and Other Neuro-Cardio-Facio-Cutaneous Syndromes. Genotype and Cardiopathy

ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Molecular characterization of congenital heart diseases now includes the not infrequent dysmorphic Noonan syndrome. A study of 6 genes of the RAS-MAPK pathway in Spanish patients is presented: the impact of heart disease, clinical expressivity, and diagnostic yield are investigated.

**Methods:** The study included 643 patients (and 182 family members) diagnosed by dysmorphologists, cardiologists, and pediatric endocrinologists from 74 tertiary hospitals. Bidirectional sequencing analysis of *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *BRAF*, *KRAS* and *HRAS* focused on exons carrying recurrent mutations accounting for 80% to 95% of previously described mutations.

Keywords:

Pulmonary stenosis

Hypertrophic cardiomyopathy

Gene mutation

RAS-MAPK genes

\* Autor para correspondencia: Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Hospital Infantil, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Dr. Esquerdo 46, 28007 Madrid, España.

Correo electrónico: bezquieta.hgugm@salud.madrid.org (B. Ezquieta).

**Results:** Mutations were detected in 230 patients (91 women and 139 men) in 200 (31%) families (172 *PTPN11*+, 14 *SOS1*+, 9 *RAF1*+, 5 *BRAF*+). There was specific reference to the heart defect suffered in 156 index cases: 103 patients had shown pulmonary stenosis, 12 pulmonary stenosis with hypertrophic cardiomyopathy, 18 hypertrophic cardiomyopathy, and 14 other cardiopathies; heart disease was absent in 9 index cases. Heart disease had not been documented in 23 of 30 family members with positive genotype and compatible clinical signs. Diagnostic yield was higher ( $P=.016$ ) for samples from some centers (53%; 14/32) and even from certain professionals (64%; 9/14;  $P=.019$ ). Characterization rate was 18% in patients for whom clinical data were not available. Genotyping led to a more precise diagnosis in 26 patients.

**Conclusions:** Most patients (94%) with a positive genotype had known congenital heart disease, 79% pulmonary stenosis and 12% hypertrophic cardiomyopathy. Cardiopathy had not been documented in 76% of family members carrying the mutation. Molecular study is a useful tool in these syndromes but a more rigorous clinical diagnosis should be intended as well.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

© 2011 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Abreviaturas

CFC: síndrome cardiofaciocutáneo  
EP: estenosis de la válvula pulmonar  
MH: miocardiopatía hipertrófica  
SN: síndrome de Noonan

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de Noonan<sup>1</sup> (SN) (OMIM 163950) es un síndrome hereditario considerado relativamente frecuente en la población (1:2.500). Sus signos clínicos son: una dismorfia facial característica, talla baja, cuello ancho y deformidad pectoral, criptorquidia en varones y cardiopatía<sup>2-4</sup> (generalmente estenosis de la válvula pulmonar [EP] y también miocardiopatía hipertrófica [MH]), y se aceptan de manera generalizada los criterios de Van der Burgt<sup>5</sup> para su diagnóstico. Es una entidad monogénica dominante que a menudo aparece *de novo*.

El SN ha pasado de ser interpretado como el «Turner de los varones» a ser reconocido como un síndrome debido a la alteración puntual monoalélica (dominante) de genes autosómicos. Las mutaciones del gen *PTPN11* en 12q24.1 que codifica una fosfatasa SHP2 son las primeras alteraciones que se documentaron<sup>6</sup> en aproximadamente un 50% de los pacientes. Posteriormente se detectó que algunos pacientes *PTPN11* negativos (2-5%) presentaban mutación en *KRAS*<sup>7,8</sup> (12p12.1), lo que puso en evidencia que las alteraciones de la vía RAS/MAPK podían dar lugar al síndrome. Esta vía reguladora, inicialmente conocida por su implicación en procesos tumorales, controla el equilibrio proliferación/apoptosis y migración celular y, por lo tanto, la morfogénesis. A diferencia de las mutaciones oncogénicas que son de tipo somático y se limitan al clon afectado, la alteración en el síndrome dismórfico ocurre en línea germinal y es compatible con la viabilidad del individuo. Las variantes que causan uno u otro tipo de afección generalmente son distintas<sup>8</sup>.

Los estudios más recientes han establecido que las alteraciones de otros genes codificantes de las proteínas de la vía RAS/MAPK, las cinasas *RAF*<sup>10,19</sup> (en 3p25), *BRAF*<sup>11</sup> (en 7q34) y *MEK1*<sup>12</sup> (en 15q21) y la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina *SOS1*<sup>13,14</sup> (en 2p22-p21), contribuyen también a la base molecular del SN. El gen *SOS1*, aunque fue descrito posteriormente, ha pasado a ocupar la segunda posición en cuanto a su contribución al SN, el 20% de los *PTPN11* negativos<sup>15</sup>. Recientemente<sup>16</sup> se han documentado también mutaciones en *NRAS* (1p13.2), aunque con una frecuencia mucho menor (0,4%).

Paralelamente se puso de manifiesto que varios síndromes que mostraban cierto solapamiento fenotípico con el SN, como el LEOPARD<sup>17-19</sup> (OMIM 151100), el cardiofaciocutáneo<sup>12,20</sup> (CFC, OMIM 115150), el de Costello<sup>21</sup> (OMIM 218040), la neurofibromatosis tipo I<sup>22</sup> (OMIM 162200) y Legius (OMIM 611431), también se deben a alteraciones de esta vía, y se extendía la implicación a *HRAS* (en 11p15.5), *SPRED* (en 15q13.2) y *MEK2* (en 19p13.3). Todos estos síndromes dismórficos presentaban mutaciones dominantes y recurrentes, y se ha propuesto una denominación común para este grupo de entidades: «síndromes RAS-MAPK», «neurocardiofaciocutáneos» o «rasopatías»<sup>23,24</sup>. Existen asociaciones entre algunos signos clínicos y los genes implicados que pueden ayudar a establecer una estratificación del análisis molecular<sup>25-31</sup>.

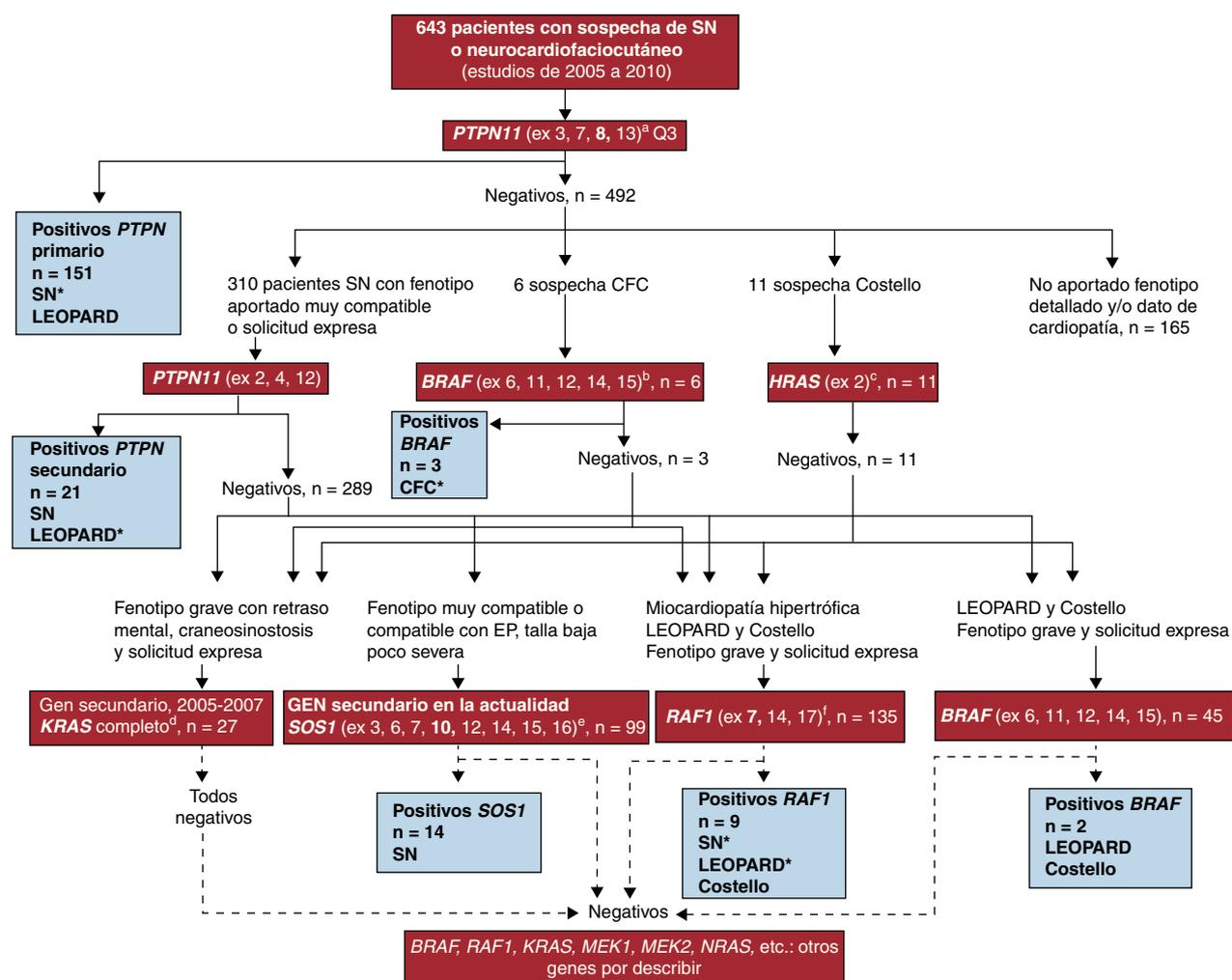
Los objetivos de este trabajo son conocer el perfil genotípico y el rendimiento diagnóstico del análisis molecular en los pacientes españoles con síndrome de Noonan y relacionados y, en quienes han resultado portadores de mutación, valorar el impacto de la cardiopatía y la expresividad clínica.

## MÉTODOS

### Pacientes

En este trabajo se incluyen los resultados del análisis molecular realizado entre enero de 2005 y diciembre de 2010 en un total de 643 pacientes (397 varones y 246 mujeres) en quienes se sospechaba SN o síndrome neurocardiofaciocutáneo relacionado (figura). Solicitaron los estudios los especialistas responsables de los pacientes (cardiólogos, endocrinopediatras y dismorfólogos genetistas, y con menor frecuencia neuropediatras y neonatólogos) que realizaron el consejo genético antes y después de la prueba y obtuvieron el consentimiento informado en el hospital de origen. Las muestras procedían de 74 hospitales de 11 comunidades. El formulario preanalítico que se ofreció a todos los centros (material adicional) se basa en el utilizado por Zenker et al<sup>27</sup> en el estudio que mostraba la más rigurosa selección fenotípica y la superior caracterización genotípica.

Eran principalmente pacientes pediátricos; el 95% eran menores de 20 años ( $8,58 \pm 17,2$  años). Se analizó a 182 familiares en 98 familias (15%). Se encontró mutación en 230 pacientes, 30 de ellos familiares. De 196 pacientes portadores de mutación, se disponía de datos clínicos, con referencia explícita al tipo de cardiopatía padecida en 156 (ausente en 9 de ellos). Con el fin de evitar sesgos en la disponibilidad de datos o hacer más subjetiva la exploración clínica de los pacientes portadores de mutación, se evitó solicitar información una vez obtenido el dato molecular, aunque se nos comunicó que se había modificado el diagnóstico clínico de algunos pacientes.



**Figura 1.** Diagrama de flujo ilustrativo del estudio de genes de la vía RAS-MAPK realizado en los pacientes. Genes estudiados, signos clínicos y/o el síndrome sospechado en los pacientes y número de muestras sometidas a cada estudio en el periodo 2005-2010 recogido en el trabajo. Los genes analizados se enmarcan en recuadro rojo y entre paréntesis se indican los exones recurrentes analizados. En recuadro azul se indica el número de pacientes portadores detectados y los síndromes que presentaban, con asterisco (\*) el más frecuente. El estudio primario de *PTPN11* se aplicó a todas las muestras; se excluyó de análisis adicionales a los pacientes de los que no se disponía de fenotipo detallado y/o dato de cardiopatía en el periodo cubierto por el estudio, aunque se los contabilizó para el cálculo del rendimiento diagnóstico general del análisis molecular. <sup>a</sup>El estudio primario de *PTPN11* (4 exones donde se ha documentado el 86% de las mutaciones descritas para este locus<sup>6</sup>) se realizó en todas las muestras, y el secundario (3 exones adicionales, con los que en total se cubre el 99% de las mutaciones descritas en la literatura internacional<sup>25-28</sup>) se aplicó sistemáticamente a los pacientes con fenotipo disponible y cardiopatía tipo estenosis de la válvula pulmonar o miocardiopatía hipertrófica y en los LEOPARD. Se analizaron otros genes de forma complementaria, como se indica en el diagrama. <sup>b</sup>*BRAF* es el gen analizado en los pacientes con síndrome cardiofaciocutáneo y se estudia de forma secundaria en los pacientes con síndrome de Costello, en los LEOPARD negativos para *PTPN11* y *RAF1*. <sup>c</sup>El análisis *HRAS* fue el estudio inicial en los pacientes con síndrome de Costello y se dirigió a las Gly12 y Gly13 que se encuentran mutadas en un 85-90% de estos pacientes<sup>21</sup>. <sup>d</sup>*KRAS* fue en una primera etapa el segundo gen a analizar en síndrome de Noonan, síndrome de Costello y síndrome cardiofaciocutáneo. Actualmente ha sido desplazado por <sup>e</sup>*SOS1* (síndrome de Noonan) y <sup>f</sup>*RAF1* (pacientes con miocardiopatía hipertrófica, LEOPARD y síndrome de Costello) en nuestros estudios secundarios. CFC: síndrome cardiofaciocutáneo; EP: estenosis de la válvula pulmonar; SN: síndrome de Noonan.

Para el estudio molecular, se manejaron fundamentalmente dos tipos de muestras, sangre anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético o ADN extraído en el hospital solicitante. En muy pocas ocasiones se analizaron otros tejidos: tejidos renal y hepático de una necropsia de un fallecido a término y cuatro muestras prenatales.

### Estudio genético molecular

El estudio molecular se inició en 2005 con el análisis de *PTPN11*; los genes descritos posteriormente se incorporaron al estudio, como se muestra en la figura, que detalla el proceso de

genotipificación. El diagrama no debe interpretarse como un algoritmo definitivo, porque la base molecular de estos síndromes no se conoce totalmente; la serie no es exhaustiva en los genes analizados y sigue abierta a la aportación de datos para la estratificación y caracterización de nuevos casos. En 81 pacientes se analizaron dos genes; en 38, tres; en 15, cuatro; en 6, cinco y en 1, los seis genes. En los 182 familiares, el estudio se dirigió al exón mutado en el paciente índice de la correspondiente familia, para detectar o descartar la alteración. La secuenciación se realizó de forma bidireccional utilizando dideoxinucleótidos fluorescentes y ABI Prism® 3100 (Línea Instrumental de Secuenciación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón) analizando los resultados con SeqScape 2.5.

Las alteraciones detectadas no descritas previamente se valoraron *in silico* mediante: MutPred<sup>32</sup> versión 1.2 (Buck Institute, Indiana University; <http://mutpred.mutdb.org>) y SIFT<sup>33</sup> versión 4.0.3 (J. Craig Venter Institute; <http://sift.jcvi.org>). Estos programas exploran la conservación evolutiva y la funcionalidad de la proteína mutada (deducida a partir de la alteración del plegamiento, la interacción de residuos aminoacídicos neutros o cargados y otras características de los modelos funcionales acordes) y permiten inferir el potencial carácter patogénico de un cambio de secuencia.

Los datos se analizaron mediante el test de comparación de proporciones de EpiDat 3.1.

## RESULTADOS

### Estudios genotípicos

En la *tabla 1* se recogen las alteraciones detectadas en 200 pacientes españoles (126 varones y 74 mujeres) y la cardiopatía que más frecuentemente se encontró asociada. La serie incluye tanto a los pacientes *de novo* como a los pacientes índice de las formas

familiares detectadas. La distribución por sexos de los pacientes portadores de mutación refleja el sesgo hallado en la muestra original. La *figura* muestra el diagrama del estudio aplicado y los síndromes asociados a las distintas mutaciones.

### PTPN11

La tasa de caracterización obtenida para el estudio de *PTPN11* fue del 27% (172/643 pacientes). El rendimiento diagnóstico de *PTPN11* se incrementa al 43% (128/292) si consideramos únicamente el grupo de pacientes de los que constaba la existencia de cardiopatía. Sólo 9/129 (7%) pacientes *PTPN11* positivos no presentaban cardiopatía.

La distribución de la frecuencia de mutaciones fue del 34% en zona reguladora, el 4% en zona puente y el 62% en zona dominio fosfatasa. Se detectaron formas *de novo* y familiares en ambas zonas, reguladora y centro activo (*tabla 1*). La alteración más recurrente, p.Asn308Asp (n = 47), se localiza en el dominio fosfatasa, aunque también se detectó el cambio p.Asn308Ser (n = 9). En total, 107 alelos mutados se localizaron en este dominio. Las mutaciones de la región reguladora del centro activo constituyen el segundo bloque mayoritario (59 pacientes).

**Tabla 1**  
Alteraciones de los genes *RAS-MAPK* detectadas en 200 pacientes índice con síndrome de Noonan y otros síndromes neurocardiofaciocutáneos. Casos *de novo* y formas familiares. Genotipo y cardiopatía

Gen	Dominio proteína	Exón	Genotipo <sup>a</sup>	Portadores de la alteración	Distribución de frecuencias <sup>b</sup>	Pacientes índice (n.º de casos)					
						Forma <i>de novo</i>	Forma familiar	Cardiopatía <sup>c</sup>	Con cardiopatía	Sin cardiopatía	
<i>PTPN11</i>	Dominio regulador	2	p.Thr42Ala	4	2%	4	0	EP*	3		
		3	p.Thr52Ile	1	1%	0	1	EP	1		
		3	p.Asn58Asp, p.Asn58His, Asn58Lys	5	3%	5	0	EP* (3), otra	4		
		3	p.Gly60Ala, p.Gly60Ser	4	2%	4	0	EP	2	1	
		3	p.Asp61Gly, p.Asp61Asn	8	5%	8	0	EP* (5), otra	7	1	
		3	p.Tyr62Asp	2	1%	2	0	EP* (1), otra	2		
		3	p.Tyr63Cys <sup>d</sup>	10	6%	7	3	EP* (5), otra	6		
		3	p.Ala72Gly, p.Ala72Ser	9	5%	9	0	EP* (6), MH	8		
		3	p.Thr73Ile, p.Thr73Leu	3	2%	3	0	EP*	1	1	
		3	p.Glu76Asp	1	1%	1	0				
		3	p.Gln79Arg	9	5%	7	2	EP (5)	5		
		3	p.Asp106Ala	3	2%	3	0	EP*	3		
		Región puente	4	p.Glu110Lys	1	1%	1	0			
			4	p.Glu139Asp	6	3%	6	0	EP*	5	1
		Dominio centro activo	7	insCAA(Gln256) <sup>e</sup>	1	1%	0	1			
7	p.Gln256Arg		1	1%	1	0	EP	1			
7	p.Leu261Phe		1	1%	1	0					
7	p.Gly268Cys		1	1%	1	0			1		
7	p.Tyr279Cys		5	3%	4	1	EP (1), MH	2			
7	p.Ile282Val		3	2%	3	0	EP* (1), otra	2			
7	p.Phe285Leu,		5	3%	4	1	EP* (2), otra	3			
8	p.Phe285Cys, p.Phe285Ser		3	2%	3	0	EP*	2			
8	p.Asn308Asp, p.Asn308Ser		56	33%	53	3	EP* (33), MH, otra	37	3		
12	p.Ala461Ser, p.Ala461Thr		2	1%	2	0	MH*	2			
12	p.Thr468Met		9	5%	8	1	EP* (5), MH*	9			
13	p.Pro491Ser, p.Pro491Thr		4	2%	3	1	EP*	3			
13	p.Ser502Ala, p.Ser502Leu		2	1%	2	0	EP*	2			
13	p.Gly503Arg	1	1%	1	0	EP*	1				
13	p.Met504Val	10	6%	8	2	EP* (5), MH	7				
13	p.Gln510Glu, p.Gln510Pro, p.Gln510Arg	3	2%	2	1	EP (1), MH	2	1			

**Tabla 1** (Continuación)

Alteraciones de los genes *RAS-MAPK* detectadas en 200 pacientes índice con síndrome de Noonan y otros síndromes neurocardiofaciocutáneos. Casos *de novo* y formas familiares. Genotipo y cardiopatía

Gen	Dominio proteína	Exón	Genotipo <sup>a</sup>	Portadores de la alteración	Pacientes índice (n.º de casos)					
					Distribución de frecuencias <sup>b</sup>	Forma <i>de novo</i>	Forma familiar	Cardiopatía <sup>c</sup>	Con cardiopatía	Sin cardiopatía
<i>SOS1</i>	Dominio DH	6	p.Thr266Lys	2		11	3	EP*	2	
		6	p.Met269Thr	2				EP*	2	
		7	p.Asp309Tyr	1				otra	1	
	Dominio PH	10	p.Trp432Arg	2				EP*	2	
	Dominio unión PH-REM	10	p.Ser548Arg	1				EP	1	
		10	p.Arg552Ser, p.Arg552Gly, p.Arg552Trp	5				EP* (4)	5	
		10	c.1330_1332del <sup>f</sup>	1				EP	1	
<i>RAF1</i>	Dominio CR2	7	p.Ser257Leu	5		9	0	MH*	5	
		7	p.Ser259Phe	1				MH	1	
		7	p.Pro261His, p.Pro261Thr	2				MH*	2	
	Dominio activación (CR3)	14	p.Glu478Lys	1				MH	1	
<i>BRAF</i>	CRD (CR1)	6	p.Gln257Arg	2		5	0	MH, otra	2	
	Dominio activador (CR3)	12	p.Glu501Lys	2				EP*	2	
		14	p.Asn581Asp	1						
						180	20		147	9
Totales				200		200			156	

EP: estenosis de la válvula pulmonar; MH: miocardiopatía hipertrófica.

<sup>a</sup> Las alteraciones detectadas en los pacientes españoles eran, con excepciones<sup>e,f</sup>, mutaciones ya documentadas en pacientes con síndrome de Noonan u otros neurofaciocutáneos en otras poblaciones. No se incluyen las variantes intrónicas ni los polimorfismos descritos en zonas codificantes. En la figura se indican 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 los demás genes, dado el número reducido de alelos portadores.

<sup>c</sup> Se señala con \* el tipo de cardiopatía que se encontraba presente o resultó predominante en los pacientes portadores de la alteración indicada en la columna de genotipos. Cuando se encontró asociado más de un tipo de cardiopatía, se indica entre paréntesis el número de pacientes con estenosis de la válvula pulmonar (EP).

<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 (3 casos). 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*<sup>32,33</sup> (véase «Métodos») indican 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> 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.

El perfil fue más heterogéneo con 12 residuos implicados, aunque afectan primordialmente al exón 3.

## KRAS

El estudio del gen *KRAS* se planteó inicialmente 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.

## SOS1

En el periodo recogido en este estudio se caracterizó a 14 pacientes, todos con diagnóstico de SN que asociaba cardiopatía, primordialmente EP pero también ocasionalmente MH. El exón 10 mostró una alta recurrencia, concretamente la alteración del residuo arginina 552 se detectó en 5 pacientes, con tres tipos de cambios de aminoácido p.Arg552Gly, p.Arg552Ser y p.Arg552Trp. En esta región hemos tenido ocasión de detectar una alteración *de novo* no descrita previamente: p.Asp430del (c.1330\_1332del, anteriormente c.1330\_1332delATG). Se trata de una delección «en fase» que implica a un aminoácido fuertemente conservado:

aspartato 430 (manuscrito en preparación). En tres de las 14 familias con mutación en *SOS1* se detectó a familiares afectados.

## RAF1

En esta serie 9 pacientes presentaron mutación en *RAF1*; la alteración más recurrente (5 casos) fue 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*<sup>9</sup>. Se confirmó que los padres asintomáticos no presentaban la alteración, por lo que la mutación se había producido *de novo* en línea germinal. En 2 pacientes no relacionados y procedentes de distintos hospitales con sospecha de Costello, se detectó la mutación p.Ser257Leu del gen *RAF1* (casos 6 y 9; tabla 2).

## HRAS

El estudio de *HRAS* aplicado a los pacientes con sospecha de síndrome de Costello descartó las alteraciones recurrentes en todos los analizados en el periodo cubierto por este estudio. En 3 pacientes con esta sospecha diagnóstica se caracterizaron mutaciones en alguno de los genes analizados (Figura).

**Tabla 2**

Pacientes y familiares de síndromes RAS-MAPK en los que el diagnóstico molecular reorientó el diagnóstico clínico

Caso <sup>a</sup>	Familia	Pacientes Casos índice	Diagnóstico inicial	Genotipo	Diagnóstico final
1	1	Índice	Noonan	<i>PTPN11</i> -p.Thr468Met	LEOPARD
2	2	Índice	Neurofibromatosis tipo I con MH	<i>PTPN11</i> -p.Thr468Met	LEOPARD <sup>16</sup>
3	3	Índice	Neurofibromatosis tipo I con MH	<i>PTPN11</i> -p.Thr468Met	LEOPARD <sup>16</sup>
4	4	Índice	Neurofibromatosis tipo I con MH	<i>PTPN11</i> -p.Thr468Met	LEOPARD <sup>16</sup>
5	5	Índice	Neurofibromatosis tipo I con MH	<i>PTPN11</i> -p.Thr468Met	LEOPARD
6	6	Índice	Costello <sup>c</sup>	<i>RAF1</i> -p.Ser257Leu	Noonan con MH
7	7	Índice	Noonan	<i>BRAF</i> -p.GlnQ257Arg	CFC
8	8	Índice	Cardiopatía, sin diagnóstico sindrómico	<i>BRAF</i> -p.GlnQ257Arg	LEOPARD
9	9	Índice	Costello <sup>c</sup>	<i>RAF1</i> -p.Ser257Leu	Noonan con MH
Familiares					
10	10	Madre	LEOPARD familiar	<i>PTPN11</i> -normal	No afectada, efélides muy abundantes
11	10	Afectado (índice)	LEOPARD familiar	<i>PTPN11</i> -p.Asn308Asp	Noonan <i>de novo</i>
12	11	Madre (índice)	Talla baja y facies sugestiva no diagnosticada	<i>PTPN11</i> -p.Tyr63Cys	Noonan
13	11	Hijo <sup>b</sup>	<i>Hidrops foetalis</i> (muerte neonatal)	<i>PTPN</i> -p.Tyr63Cys	Noonan
14	12	Madre	Talla baja y <i>pterygium coli</i> (sospecha de Turner)	<i>PTPN</i> -p.Asn308Asp	Noonan
15	13	Padre	Criotorquidia	<i>PTPN</i> -p.Pro491Thr	Noonan
16	14	Padre	Criotorquidia bilateral	<i>SOS1</i> -p.Arg552Trp	Noonan
17	15	Madre	Talla baja y fenotipo levemente sugestivo	<i>PTPN11</i> -normal	No afectada
18 a 26		Otros familiares <sup>d</sup>	No consulta, clínica actual en evaluación	7 <i>PTPN</i> + y 2 <i>SOS1</i> +	Noonan

CFC: síndrome cardiofaciocutáneo; MH: miocardiopatía hipertrófica.

<sup>a</sup> Los casos recogidos en esta tabla son exclusivamente aquellos cuyo cambio de diagnóstico nos consta, por lo que la selección puede no ser exhaustiva.<sup>b</sup> Estudio de necropsia, tejidos renal y hepático.<sup>c</sup> Dos pacientes no relacionados procedentes de distintos hospitales con sospecha de síndrome de Costello presentaron la mutación p.Ser257Leu del gen *RAF1*.<sup>d</sup> Nueve familiares con genotipo positivo de los que no se consignó que tuvieran signos clínicos.

## BRAF

Se detectó a 5 pacientes *BRAF* positivos. En 3 de ellos, se confirmó el diagnóstico clínico original de CFC; en los otros 2, se reorientó por el hallazgo molecular (tabla 2; casos 7 y 8).

La suma de las tasas de caracterización obtenidas para cada uno de los exones analizados alcanza un 63% en los estudios estratificados por fenotipo, acorde con la franja descrita en la literatura. El incremento del número de genes analizados mejora la caracterización, aunque de forma cada vez menos eficiente: el 20% (16/81), el 13% (5/38) y el 6% (1/15) con 2, 3 y 4 genes. En el grupo analizado para 5 genes (6 casos), sin embargo, se caracterizó a 2 pacientes, aunque uno resultó positivo para *SOS1*, que actualmente ha desplazado a *KRAS* y se analiza como segunda opción del análisis molecular.

## Relaciones genotipo-fenotipo

Todos los genes y todas las alteraciones moleculares asociaron tanto EP como MH en unos u otros pacientes (tabla 1), aunque la EP aparecía en todas ellas y la MH se encontró más limitada (aunque no exclusivamente) a *RAF1* y a la mutación concreta de *PTPN11* p.Thr468Met. La cardiopatía más relacionada con la recurrente alteración de *PTPN11* p.Asn308Asp fue la EP (33 de los 40 pacientes con signos informados), sólo 1 paciente presentaba MH y en 3 no había cardiopatía. Las mutaciones en *RAF1* se observaron más frecuentemente en los pacientes con MH (9/40 con MH frente a 0/28 con EP) y en el LEOPARD (2/12). La mutación p.Thr468Met asoció muy fuertemente el fenotipo LEOPARD y, de hecho, en algunos de los pacientes el dato molecular anticipó el diagnóstico clínico del LEOPARD, ya que las manchas café con leche y lentigos típicos aparecieron posteriormente (tabla 2; caso 1). Curiosamente aunque el acrónimo dirige la atención a la EP, en nuestra serie cerca

de la mitad de los pacientes con esta sospecha diagnóstica han mostrado MH. En 3 pacientes referidos por Carcavilla et al<sup>19</sup>, el diagnóstico inicial había sido de neurofibromatosis tipo I.

Las alteraciones hematológicas se encontraron primordialmente asociadas al exón 3 de *PTPN11*; algunos eran diagnósticos neonatales<sup>30</sup>. Sin embargo, en ninguno de nuestros pacientes con mutación del aminoácido típicamente asociado<sup>25</sup> Thr73 se habían manifestado estos procesos; aunque todos eran pacientes pediátricos.

El solapamiento genotípico y fenotípico de los síndromes neurocardiofaciocutáneos puede observarse en la figura, donde se indica para cada gen el número de pacientes que padecían los distintos síndromes. En al menos 9 pacientes índice, la mutación identificada reorientó el diagnóstico de sospecha por el que los habían remitido (tabla 2).

## Estudios familiares

Las formas familiares se detectaron en pacientes portadores de mutaciones en *PTPN11* (n = 17; 11 en la región codificante del dominio centro activo y 6 en la región reguladora) y en *SOS1* (n = 3) (tabla 1). Se detectaron en total 30 casos de familiares portadores de mutación en estas 20 familias. La herencia fue más frecuentemente materna: 14 casos índice pediátricos cuya madre resultó portadora y 1 paciente adulta cuya hija resultó afectada. En un paciente índice la sospecha diagnóstica en la madre fue consecuencia de una muerte perinatal. La confirmación molecular en la madre precedió al estudio *post mortem* que confirmó el diagnóstico (tabla 2; caso 13). Los demás casos familiares detectados correspondieron a 7 hermanos en 6 familias, un tío y un abuelo, ambos maternos. En una forma familiar (madre e hijo portadores), el estudio de los abuelos pudo documentar que la mutación se había producido *de novo* en esa generación previa.

**Tabla 3**

Rendimiento diagnóstico del estudio molecular obtenido para las muestras de pacientes procedentes de una selección de hospitales del ámbito nacional con un número de solicitudes no inferior a 9 en el periodo analizado 2005-2010

Hospital <sup>a</sup>	Estudios solicitados <sup>b</sup>	Sólo pacientes índice	Casos positivos <sup>c</sup>	Pacientes índice positivos	Rendimiento <sup>d</sup>
1	137	105	34	30	28,6%
2	100	70	19	15	21,4%
3	51	49	17	17	34,7%
4	53	44	13	13	29,5%
5	46	44	12	11	25%
6	55	32	20	17	53,1%
7	33	30	8	6	20%
8	29	26	11	11	42,3%
9	28	25	2	2	8%
10	31	24	4	4	16,7%
11	26	22	9	9	40,9%
12	35	19	11	7	36,8%
13	30	19	9	9	47,4%
14	20	17	3	2	11,8%
15	18	15	6	5	33,3%
16	16	13	4	5	38,5%
17	12	11	5	5	45,5%
18	9	6	4	3	50%
Total		571		171	34,0%

<sup>a</sup> Ordenados por el número de estudios solicitados en el periodo 2005-2010 desde el centro en cuestión.

<sup>b</sup> Incluye todas las muestras analizadas, pacientes índice y familiares afectados y no afectados.

<sup>c</sup> Se refiere al total de pacientes y casos familiares portadores de mutación.

<sup>d</sup> El rendimiento se calcula a partir del número de pacientes índice analizados y caracterizados (positivos) debido a que los estudios de los ADN parentales, solicitados por consejo genético en ausencia de un fenotipo sugestivo, frecuentemente son negativos en ambos progenitores. El rendimiento resulta discretamente superior al general, lo que quizá refleje la mayor experiencia derivada de la casuística más amplia de estos centros.

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 4 casos había signos clínicos compatibles que no habían llevado al diagnóstico (talla baja, criptorquidia) y en 9 casos no había habido consulta, diagnóstico o evaluación previa al hallazgo molecular (tabla 2). Sólo en 3 de los 19 adultos positivos detectados en el estudio familiar, la cardiopatía se había diagnosticado previamente.

### Rendimiento diagnóstico por centros y facultativos

El rendimiento diagnóstico obtenido no fue homogéneo y se observaron diferencias entre los distintos hospitales solicitantes. En la tabla 3 se recogen los datos relativos a los centros con un número de estudios solicitados no inferior a 9 pacientes (tasa máxima del 54%). Aunque no se muestra la caracterización desglosada por profesionales, sí debemos reseñar que para algún facultativo superó este porcentaje (9/14, 64,3%;  $p = 0,01$ ).

### Rendimiento diagnóstico y cardiopatía

El rendimiento general del estudio molecular (200/643; 31%) se incrementa al 50% (147/292) si nos ceñimos a los pacientes con cardiopatía, y al 62% (134/218) si esta era del tipo EP y/o MH. Cabe destacar que el tipo de cardiopatía en los pacientes portadores de mutación fue mayoritariamente EP y/o MH (139/156; 89%), mientras que el espectro de la cardiopatía se diversificaba y este porcentaje resultaba menor en los pacientes que no presentaban mutación (84/147 [54%] con EP y/o MH;  $p < 0,0001$ ). La ausencia de cardiopatía, una rareza en el grupo de pacientes portadores de mutación (9/156), resultó menos infrecuente en el grupo de pacientes negativos (101/343;  $p < 0,0001$ ).

Se observó un menor rendimiento diagnóstico en el grupo de pacientes de cuyos datos fenotípicos no se disponía (el 18 frente al 31%;  $p = 0,0002$ ). La exclusión de pacientes sin información relativa a la cardiopatía incrementaba el rendimiento diagnóstico (156/400 [39%];  $p = 0,01$ ).

### DISCUSIÓN

La caracterización molecular de 230 pacientes españoles con SN u otros síndromes RAS-MAPK ha permitido la confirmación del diagnóstico clínico y ha facilitado un diagnóstico diferencial más preciso. Esta clasificación más efectiva apoyada en la evaluación genómica puede facilitar unos tratamientos mejor orientados, como señalaba Rodríguez-Marín<sup>34</sup>.

Las alteraciones detectadas en nuestra población han sido en su gran mayoría mutaciones ya descritas, lo que facilitó la elaboración de los informes de diagnóstico. La distribución de las mutaciones fue similar a lo publicado sobre otras poblaciones<sup>25-28</sup>. Las alteraciones en algunos aminoácidos, *PTPN11*-Asn308, *SOS1*-Arg552 y *RAF1*-Ser257, fueron recurrentes.

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 MH hace primordial el estudio de *RAF1* en los pacientes *PTPN11* negativos, y cuando hay rasgos de 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 2 casos no relacionados con sospecha de Costello, generalmente asociado a *HRAS*<sup>21</sup>, se detectó una misma mutación de *RAF1*. El diagnóstico diferencial se vio facilitado muy especialmente en el periodo neonatal<sup>30</sup> y en el LEOPARD<sup>19</sup>. El estudio estratificado planteado es acorde con las recomendaciones actuales de Romano et al<sup>29</sup>, que

proponen un abordaje estratificado basado en el fenotipo frente a genotipificación mediante *arrays*.

El diagnóstico molecular ha permitido descartar el síndrome en algunos familiares que compartían signos pero no padecían la enfermedad y pudo confirmar *post mortem* una forma familiar. No menos importante es que se detectó a familiares afectados con cardiopatía no reconocidos previamente. Cabe destacar que en dos progenitores portadores de mutación, el único signo recogido en las historias era la criptorquidia. Como se ha demostrado recientemente<sup>35</sup>, la supervivencia de los pacientes con SN y MH se encuentra significativamente reducida frente a los pacientes con MH no sindrómica, y en ocasiones la expresividad facial no facilita la detección de afectados<sup>19</sup>, lo que hace del análisis molecular una herramienta diagnóstica imprescindible. Recientemente Sánchez et al<sup>3</sup> han señalado la asociación del SN y la MH.

En los pacientes con cardiopatía tipo EP o MH, el rendimiento diagnóstico se ha visto muy favorecido, el 62 frente al 31% general. La tasa de caracterización ha sido extremadamente variable para los distintos centros, aun excluyendo aquellos con un número de estudios reducido. El rendimiento diagnóstico general, que era similar al descrito en series carentes de selección rigurosa<sup>26</sup>, alcanzó el 64% en profesionales concretos, lo que indica que el abordaje molecular planteado es adecuado y que se debe mejorar la forma de establecer la sospecha diagnóstica en nuestro medio.

Los factores que han favorecido la mayor tasa de caracterización genotípica son, aparte de la mera aportación de datos clínicos, la evaluación del paciente por dismorfólogos expertos y la existencia de cardiopatía. Los criterios clínicos de Van der Burgt<sup>5</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, quizá por ser un criterio más objetivo y uniforme, en nuestro medio es un dato que ha orientado con más especificidad la sospecha diagnóstica.

La cardiopatía es a veces el motivo de primera consulta en los pacientes con SN, y es primordial que los cardiólogos puedan sospecharla y estén sensibilizados ante un síndrome hereditario que frecuentemente aparece *de novo*, por lo que no se dispondrá del fenotipo familiar para apoyar la sospecha. Resulta esencial disponer de pruebas complementarias adecuadas y los estudios moleculares han demostrado que pueden facilitar la confirmación diagnóstica y la ayuda a los familiares. Estamos trabajando en la optimización de otros marcadores que puedan contribuir a objetivar la sospecha, como la morfometría en fotos faciales<sup>36</sup> o la detección de la sobreexpresión de mensajeros<sup>37</sup> de la vía RAS-MAPK.

Las limitaciones del estudio se derivan principalmente de la procedencia diversa de los pacientes y de la escasez de datos clínicos considerados. Su principal fortaleza reside en el número de pacientes estudiados. La obtención exhaustiva de datos clínicos que permitiría hacer un estudio de correlación genotipo/fenotipo está fuera de las pretensiones de este estudio. Por otra parte, la selección de pacientes con datos detallados podría haber sesgado los resultados obtenidos, por lo que entendemos que nuestro enfoque permite obtener una imagen más real de la situación en nuestro medio.

## CONCLUSIONES

Hay cierta heterogeneidad en la forma en que se plantea la sospecha diagnóstica de los síndromes neurocardiofaciocutáneos en nuestro medio y el dato molecular ha sido clave para diagnosticar mejor y detectar los casos familiares. El alto grado de asociación de la cardiopatía documentado, unido a la constatación de casos en los que no se había realizado el estudio

cardiológico, nos alerta sobre la importancia de que se realicen en los pacientes y familiares los estudios y las exploraciones oportunas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de los pacientes y sus familiares, así como a los distintos servicios y unidades que nos han confiado sus muestras. En especial queremos mencionar a los doctores: Zapico (Hospital de Alicante), Lapunzina (Hospital La Paz), Lopez-Siguero (Hospital Carlos Haya), Del Campo (Hospital Vall d'Hebron), Tamarit y Pozo (Hospital Niño Jesús), Rodrigo-Palacios (Hospital General Yagüe), Galán (Hospital Perpetuo Socorro), Guitart (Hospital Parc Taulí), Martínez (Hospital Reina Sofía), García-Cuartero y Carrasco (Hospital Severo Ochoa), Luzuriaga (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla), Lautre (Hospital Clínico San Carlos), Herrera (Complejo Hospitalario de Jaén) y Albiñana (Hospital de Almansa), cuyos casos han sido, por su número o sus particularidades, especialmente relevantes para el interés de este manuscrito. Begoña Ezquieta es investigadora adscrita de la U753 de CIBERER (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras).

## FINANCIACIÓN

Financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI 06/1179).

## CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

## MATERIAL ADICIONAL



Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.recesp.2011.12.016](https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.12.016).

## BIBLIOGRAFÍA

- Noonan JA. Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease. *Am J Dis Child.* 1968;116:373-80.
- Dimpna CA, Cerro MJ, Carrasco JI, Portela F. Actualización en cardiología pediátrica y cardiopatías congénitas. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64 Supl 1:59-65.
- Sanchez Andrés A, Morian o Gutiérrez A, Carrasco Moreno JI. Miocardiopatía hipertrófica intraútero y síndrome de Noonan neonatal: una asociación a recordar. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:537-8.
- García-Guereta L, Benito F, Portela F, Caffarena J. Novedades en cardiología pediátrica, cardiopatías congénitas del adulto y cirugía cardiaca de cardiopatías congénitas. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63 Supl 1:29-39.
- Van der Burgt I. Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;14:2-4.
- 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.
- Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G, et al. Germline *KRAS* mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2006;38:331-6.
- Lo FS, Lin JL, Kuo MT, Chiu PC, Shu SG, Chao MC, et al. Noonan syndrome caused by germline *KRAS* mutation in Taiwan: report of two patients and a review of the literature. *Eur J Pediatr.* 2009;168:919-23.
- 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.
- 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;39:1007-12.
- 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.
- Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, et al. Cardiofacio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK

- signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet.* 2007;44:763-71.
13. 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.
  14. Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, et al. Gain-of-function *SOS1* mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007;39:75-9.
  15. Lepri F, De Luca A, Stella L, Rossi C, Baldassarre G, Pantaleoni F, et al. *SOS1* mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2011;32:760-72.
  16. 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.
  17. Ogata T, Yoshida R. *PTPN11* mutations and genotype-phenotype correlations in Noonan and LEOPARD syndromes. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2005;2:669-74.
  18. Koudova M, Seemanova E, Zenker M. Novel *BRAF* mutation in a patient with LEOPARD syndrome and normal intelligence. *Eur J Med Genet.* 2009;52:337-40.
  19. 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.
  20. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Verloes A, et al. Germline *KRAS* and *BRAF* mutations in cardio-facial-cutaneous syndrome. *Nat Genet.* 2006;38:294-6.
  21. 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.
  22. De Luca A, Bottillo I, Sarkozy A, Carta C, Neri C, Bellacchio E, et al. *NF1* gene mutations represent the major molecular event underlying neurofibromatosis-Noonan syndrome. *Am J Hum Genet.* 2005;77:1092-101.
  23. Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19:230-6.
  24. Gelb BD, Tartaglia M. RAS signaling pathway mutations and hypertrophic cardiomyopathy: getting into and out of the thick of it. *J Clin Invest.* 2011;121:844-7.
  25. 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.
  26. Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillessen-Kaesbach G, et al. Spectrum of mutations in *PTPN11* and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:201-6.
  27. 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.
  28. Ko JM, Kim JM, Kim GH, Yoo HW. *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS*, and *RAF1* gene analysis, and genotype-phenotype correlation in Korean patients with Noonan syndrome. *J Hum Genet.* 2008;53:999-1006.
  29. 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.
  30. Bastida P, García-Miñaur S, Ezquieta B, Dapena JL, Sanchez de Toledo J. Myeloproliferative disorder in Noonan syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2011;33:e43-5.
  31. Kratz CP, Niemeyer CM, Zenker M. An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development. *J Mol Med.* 2007;85:227-35.
  32. Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, et al. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics.* 2009;25:2744-50.
  33. Ng PC, Henikoff S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:61-80.
  34. Marín-García J. Avances en genética molecular de las cardiopatías congénitas. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62:242-5.
  35. Hickey EJ, Mehta R, Elmi M, Asoh K, McCrindle BW, Williams WG, et al. Survival implications: hypertrophic cardiomyopathy in Noonan syndrome. *Congenit Heart Dis.* 2011;6:41-7.
  36. Carcavilla A, Reig S, Santomé L, Guillén-Navarro E, Lapunzina P, Lopez Siguero JP, et al. Morphometric analysis of facial photographs as a diagnostic tool in Noonan syndrome. *Horm Res Paediatr.* 2010;74 Suppl 3:106.
  37. Santomé JL, Carcavilla A, Sanchez A, Valiente L, Simon A, Ezquieta B. Molecular diagnosis in Noonan syndrome: experience recorded and new insights. *Horm Res Paediatr.* 2011;76 Suppl 2:104.