

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI E DEI SERVIZI

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/G1
Settore Scientifico disciplinare: MED/38

***I DISORDINI DEL PATHWAY RAS-MAPK O RASOPATIE: ASPETTI
DIAGNOSTICI, CLINICI E TERAPEUTICI***

Presentata da: Federica Tamburrino

Coordinatore Dottorato Chiar.mo
Prof. Nicola Rizzo

Relatore Chiar.ma
Prof.ssa Laura Mazzanti

Esame finale anno 2016

INDICE

Capitolo 1 Aspetti clinici e molecolari delle RASopatie

1.1. Definizione del termine “Rasopatie”.....	4
1.2. Il pathway di trasduzione del segnale RAS-MAPK.....	5
1.3. Cenni storici sullo sviluppo delle indagini molecolari.....	7
1.4. Rasopatie: aspetti clinici e molecolari.....	7
1.4.1. Sindrome di Noonan.....	8
1.4.2. Sindrome Cardio-Facio-Cutanea.....	26
1.4.3. Sindrome di Costello.....	32
1.4.4. Sindrome di Noonan con lentiggini multiple.....	39
1.4.5. Sindrome Mazzanti (NS/LAH).....	44
1.4.6. Sindrome di Legius.....	48
1.4.7. Sindrome associata a mutazione di CBL.....	51
1.4.8. Approcci terapeutici e follow-up	52

Capitolo 2 Rasopatie, bassa statura e terapia con GH

2.1 Bassa statura e andamento accrescitivo nelle Rasopatie.....	59
2.1.1. Meccanismi causativi di bassa statura e risposta alla terapia con ormone della crescita in pazienti con RASopatia.....	61
2.2 Asse GH/IGF1.....	63
2.2.1 Mutazione di PTPN11: influenza sull’andamento accrescitivo e sul trattamento.....	69
2.3 Aspetti generali della terapia con ormone della crescita.....	70
2.3.1. Efficacia e sicurezza.....	73

Capitolo 3: Il nostro studio

3.1. Scopo della tesi.....	75
3.2. Materiali e Metodi.....	76
3.3. Risultati.....	82
3.4. Discussione.....	96
3.5. Conclusioni.....	98
<i><u>Bibliografia</u></i>	99

CAP. 1 ASPETTI CLINICI E MOLECOLARI DELLE RASOPATIE

1.1 DEFINIZIONE DEL TERMINE “RASOPATIE”

I “Disordini del pathway di trasduzione del segnale RAS-MAPK” o “RASopatie”, includono un gruppo di patologie congenito-malformative a trasmissione autosomica-dominante, causate da mutazioni eterozigoti germinali in geni che codificano per proteine coinvolte nel pathway RAS-MAPKinasi (protein-kinasi attivate da mitogeni) [Zenker, 2011]. La disregolazione di questa cascata di trasduzione del segnale influisce profondamente sullo sviluppo embriogenetico, l’organogenesi, la plasticità sinaptica e la crescita [Tartaglia et al., 2011].

Sono patologie ad interessamento multisistemico caratterizzate principalmente da dismorfismi faciali, iposomia, cardiopatia congenita e cardiomiopatia ipertrofica, anomalie ectodermiche e scheletriche, coinvolgimento cognitivo e suscettibilità tumorale, benché ogni elemento fenotipico abbia una prevalenza variabile in ogni sindrome specifica. Le RASopatie comprendono la *Sindrome di Noonan* (SN) e patologie geneticamente e fenotipicamente ad essa correlate, quali la *Sindrome Cardio-facio-cutanea* (CFC), la *Sindrome di Costello*, la *Sindrome Noonan con lentiggini multiple* (precedentemente denominata sindrome LEOPARD), la *Sindrome Mazzanti* (Sindrome Noonan-like con loose anagen hair) e la *Sindrome di Legius*.

1.2 IL PATHWAY DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE RAS-MAPK

Le proteine RAS e le altre componenti proteiche che regolano la trasduzione del segnale nel pathway RAS-MAPK, rivestono un ruolo fondamentale nei meccanismi di proliferazione, sopravvivenza, differenziazione, migrazione e morte cellulare.

Mutazioni somatiche del proto-oncogene RAS in singole cellule sono notoriamente implicate nella tumorigenesi, e si stima che circa il 30% delle neoplasie sia associato ad un suo coinvolgimento. Mutazioni a carico di cellule germinali, che pertanto coinvolgono tutte le cellule dell'organismo, sono invece responsabili di alterazioni dell'embriogenesi determinando l'insorgenza di disordini dello sviluppo. La maggior parte delle mutazioni germinali a carico dei geni del pathway RAS-MAPK determinano un guadagno di funzione della proteina codificata con secondaria iperattivazione che si esprime in una ridotta trasduzione del segnale, anche se in minor misura rispetto alle mutazioni somatiche coinvolte nell'oncogenesi [Tydiman et al., 2009].

La proteina RAS appartiene al sottogruppo di una superfamiglia di piccole GTPasi [Takai et al., 2001] ed è una proteina G monomerica formata da α -eliche e β -sheets uniti da loops: è costituita da 2 regioni, switch-1 e switch-2, che cambiano la loro conformazione in base al legame a GDP o GTP; RAS pertanto alterna uno stato attivo in cui è legata a GTP, ad uno inattivo in cui è legata a GDP. Il sottogruppo di proteine RAS comprende HRAS, KRAS-A, KRAS-B e NRAS. Le proteine RAS sono mediatrici fondamentali nella trasduzione del segnale, che si verifica secondariamente all'attivazione di recettori di membrana da parte di stimoli extracellulari. Sono infatti proteine attivate da recettori tirosin-kinasici, recettori accoppiati a proteine G, canali del calcio ed integrine. L'attivazione del recettore da parte di fattori di crescita, ormoni e citochine, determina la dissociazione RAS-GDP e il secondario legame di RAS-GTP, grazie all'azione di

guanine-nucleotide exchange factors (GEF), come SOS, RAS guanine-releasing factor (RASGRF) e RAS guanyl releasing protein (RASGRP). Il legame RAS-GTP avvia la cascata di trasduzione del segnale costituito da protein-kinasi attivate da mitogeni, quali RAF serin-treonin kinasi (RAF1, BRAF e ARAF), MEK ed ERK (kinasi regolate da segnali extracellulari); in specifico, RAF determina l'attivazione di MAP2K1/2 (MAP kinasi kinasi) o MEK1/2; MEK 1 e MEK2 fosforilano i loro substrati, ERK1 ed ERK2, codificati dai geni MAPK3 e MAPK1 rispettivamente, che modulano l'attività di numerosi fattori citoplasmatici e nucleari, comprese proteine che giocano un ruolo di regolazione dell'espressione genica. Successivamente l'attività intrinseca GTPasica di RAS determina il ritorno di RAS in forma inattiva legata al GDP, grazie anche all'azione di proteine che attivano la GTPasi (GAPs) come la neurofibromina (NF1); NF1 agisce così come regolatore negativo.

Le altre proteine coinvolte nel pathway come SHOC2 e SPRED1 agiscono come modulatore positivo e negativo rispettivamente, a livello del punto critico di interazione RAS-RAF. La proteina CBL, infine, agisce come ubiquitin-ligasi che riconosce substrati tirosinici fosforilati e pertanto regola la trasduzione del segnale mediata da recettori tirosin-kinasici.

La disregolazione del pathway RAS-MAPK può essere determinata pertanto da mutazioni germinali dei geni che codificano per la famiglia di proteine RAS (*KRAS*, *NRAS*, *RIT1*, *RRAS*), ma anche da mutazioni in geni che modulano l'attività di RAS (PTPN11, SOS1, SHOC2, CBL, RASA2, SHOC2) o la trasduzione del segnale a valle (RAF1, BRAF, MEK1 e MEK2) [Zenker et al., 2011; Tartaglia et al., 2011; Malumbres et al., 2003; Aoki et al., 2008].

1.3 CENNI STORICI SULLO SVILUPPO DELLE INDAGINI MOLECOLARI

Nel 1994, studi di linkage su una grande famiglia di soggetti con SN, ha permesso di identificare il primo locus per la Sindrome di Noonan, definito NS1 e localizzato in posizione 12q22-qter [Van Der Burgt et al., 1994; Jamieson et al., 1994].

Nel 2001, Tartaglia e collaboratori [Tartaglia et al., 2001] hanno identificato la prima mutazione missenso a carico di PTPN11, causativa della SN. Questo è stato possibile osservando che PTPN11 era localizzato nella regione critica NS1; inoltre studi su modelli murini deficitari di PTPN11 dimostravano che il prodotto proteico del gene, la proteina SHP2, era fondamentale per lo sviluppo embriogenetico delle valvole semilunari cardiache, e pertanto PTPN11 poteva essere un possibile gene candidato posizionale, che partecipava inoltre alla trasduzione del segnale del pathway RAS-MAPK, mediando l'azione di numerosi recettori, rendendo così ragione delle multiple anomalie fenotipiche della SN. Successivamente furono ipotizzati altri geni candidati per la Sindrome di Noonan in soggetti PTPN11 negativi; utilizzando l'approccio del gene candidato e successivamente con analisi del "whole exome sequencing", sono stati pertanto identificati gli altri numerosi geni coinvolti nel pathway RAS-MAPK.

1.4 RASOPATIE: ASPETTI CLINICI E MOLECOLARI

La disregolazione del pathway RAS-MAPK è alla base di disordini dello sviluppo clinicamente correlati, definiti *Sindromi Neuro-cardio-facio-cutanee o Rasopatie*, caratterizzati da:

- dismorfismi facciali
- bassa statura
- malformazioni cardiache

- anomalie ectodermiche
- alterazioni scheletriche
- deficit cognitivo
- rischio tumorale

In questo gruppo sono incluse la Sindrome di Noonan (SN), la Sindrome Cardio-facio-cutanea (CFC), la Sindrome di Costello, la Sindrome di Noonan con lentiggini multiple (sindrome LEOPARD), la Sindrome Mazzanti e la Sindrome di Legius.

1.4.1 SINDROME DI NOONAN

La Sindrome di Noonan è una condizione genetica caratterizzata da bassa statura postnatale (50-60%), difetti cardiaci, più comunemente stenosi della valvola polmonare (50-60%) e cardiomiopatia ipertrofica (10-20%), anomalie scheletriche e tipiche stimate malformative fenotipiche.

L'espressione è variabile e altri aspetti tipici includono diatesi emorragica (20%), criptorchidismo (60-75%), anomalie ectodermiche, alterazioni del sistema linfatico e deficit cognitivo [Van Der Burgt, 1994; Noonan, 1968; Allanson, 2007; Van Der Burgt, 2007; Romano et al., 2010].

E' una condizione relativamente comune, con un'incidenza stimata fra 1: 1000-2500 nati vivi; è presente in differenti etnie ed ha una eguale distribuzione fra i due sessi [Romano et al., 2010; Nora et al., 1974].

La Sindrome di Noonan può essere ereditata in modo autosomico dominante, sebbene sia riportata una significativa incidenza, non ancora precisamente determinata, di casi sporadici.

CENNI STORICI

Nel 1963, e successivamente nel 1968, la dottoressa Jacqueline Noonan una cardiologa pediatrica dell'Università del Kentucky, condusse uno studio basato sull'osservazione di 19 pazienti affetti da anomalie cardiache congenite (17 con stenosi della valvola polmonare e 2 con dotto arterioso di Botallo pervio) con caratteristiche fenotipiche simili. I casi descritti erano sia maschi che femmine, occasionalmente questo gruppo di anomalie si presentava in più membri di una stessa famiglia [Noonan, 1963]. Pertanto fu coniato il termine "Sindrome di Noonan" per identificare questa nuova condizione ricorrente in entrambi i generi, associata a cardiopatia congenita e con possibile carattere familiare, i cui soggetti affetti presentavano normale mappa cromosomica [Opitz, 1985].

CARATTERISTICHE CLINICHE

Segni fenotipici

La sindrome di Noonan (SN) è caratterizzata da numerose ed eterogenee alterazioni del fenotipo, non sempre identificabili contemporaneamente nel paziente e tendenzialmente meno evidenti e più sfumate nel corso del tempo.

Le anomalie fenotipiche coinvolgono:

Occhi: tipicamente presentano ptosi palpebrale bilaterale, epicanto ed ipertelorismo. Nell'infanzia può essere riscontrata proptosi, meno evidente in età adulta.

A livello oculare possono inoltre manifestarsi difetti visivi tra cui errori di refrazione (61%), strabismo (48%-63%) ed ambliopia (33%).

Descritte anche alterazioni dei segmenti anteriori dell'occhio (63%), es cheratocono, e nistagmo (20%) [Lee et al, 1992].

Alcuni studi hanno mostrato anche un' aumentata incidenza di retinite pigmentosa.

Orecchie: spesso bassoimpiantate e retroruotate con elice di aumentato spessore.

Dal punto di vista funzionale, si rileva un aumento dell'incidenza di otiti medie acute (15%-40%); in una percentuale ridotta di casi sono state riportate condizioni di ipoacusia trasmissiva o neurosensoriale; il coinvolgimento delle basse frequenze è riportato nel 10% dei pazienti, e delle alte frequenze nel 25% [Qiu et al., 1998].

Bocca: labbra carnose con solchi naso-labiali evidenti; vi è solitamente una malocclusione dentaria associata a micro e retrognazia. Il palato è tipicamente alto e stretto.

A livello ortodontico diversi studi mostrano che la carie dentale è la causa più frequente di morbidità dentale fra questi pazienti e nel 15% dei casi richiede un intervento di estrazione.

Collo: tipica caratteristica della sindrome è lo *pterygium colli*, che può essere più o meno marcato, fino a raggiungere un aspetto "a sfinge". L'attaccatura posteriore del capillizio è di solito bassa e a tridente.

Regione toracica: il torace è, in genere, più largo del normale (torace "a scudo") ed è presente un *pectus excavatum* in basso e *carenum* in alto, associato o meno a teletelia. Queste anomalie toraciche sono riportate nel 70%-95% dei casi [Van Der Burgt, 2007]. In alcuni casi, particolarmente gravi, le alterazioni nella conformazione del torace sono tali da compromettere la meccanica e la funzionalità respiratoria.

Apparato scheletrico: le anomalie scheletriche sono un reperto frequente nelle RAsopatie [Stevenson et al., 2011]. Nella SN circa il 15% dei pazienti sviluppa scoliosi toracica, generalmente non progressiva, e spesso le spalle sono addotte e le scapole alate. Lee et al. [Lee et al., 2001] ha riscontrato in 60 pazienti SN una prevalenza del 30% di anomalie spinali, con indicazione alla correzione chirurgica nel 60% di questi.

Classicamente è presente cubito valgo (50%); altre anomalie descritte sono iperestensibilità articolare (50%), clino-brachidattilia (30%), piede torto equino-varo (12%) e sinostosi radio-ulnare (2%). Sono riportati casi di emivetebre e spina bifida occulta [Sharland et al., 1992].

In alcuni pazienti sono state riportate lesioni a cellule giganti della mandibola, simili al cherubismo.

Una percentuale ridottissima di pazienti sviluppa artropatie quali artrite reumatoide e poliartropatie, anche se esordiscono più frequentemente dopo la quarta decade di vita.

La maturazione ossea è in genere ritardata rispetto all'età cronologica.

Cute e annessi: frequenti nevi pigmentati (25%), macchie caffè-latte (10%) e lentigo (3%). Riportata keratosi pilare soprattutto degli arti superiori e del volto; circa 1/3 dei pazienti presenta inoltre capelli sparsi, ricci e spessi [Sharland et al., 1992].

Sistema linfatico

Displasie del sistema linfatico sono riportate nel 20% dei pazienti; possono determinare linfedema generalizzato, linfangectasie polmonari o intestinali, linfedema periferico.

In epoca prenatale possono essere presenti segni di edema o idrope fetale, a diversi livelli di gravità.

In epoca neonatale, caratteristici il linfedema del dorso delle mani e dei piedi, la “cutix laxa” e lo pterigio. Nell’infanzia sono riportati casi di chilotorace spontaneo o secondario a cardiocirurgia o chirurgia toracica [Bottner et al., 2005].

Malformazioni cardiache

La patologia malformativa cardiovascolare nella SN ha una prevalenza significativamente più elevata (superiore all’80%) rispetto alla popolazione generale.

Le malformazioni cardiache più frequenti sono [Burch et al., 1993; Marino et al., 1999]:

- stenosi della valvola polmonare (50%-62%), associata nel 25%-35% dei casi a displasia valvolare
- miocardiopatia ipertrofica (20%)
- difetto interatriale (6%-10%)
- difetto interventricolare (5%)
- persistenza del dotto arterioso pervio (3%)
- altre anomalie (canale atrioventricolare comune, anomalie della valvola mitrale)
- alterazioni elettrocardiografiche (50%) (deviazione assiale sinistra, onda Q anormale)

La stenosi della valvola polmonare è causata da displasia della valvola o ad un suo congenito ispessimento. Il reperto ecocardiografico, peraltro, mostra usualmente la presenza di tre distinte cuspidi valvolari, senza la fusione commisurale, condizione che predispone ad un movimento disorganizzato della struttura valvolare stessa. Questa condizione anatomica, associata al possibile ispessimento dell’endotelio valvolare, comporta la realizzazione di un meccanismo ostruttivo che può alterare l’effusione del sangue nell’arteria polmonare.

La cardiomiopatia ipertrofica interessa soprattutto il ventricolo sinistro. La condizione sembrerebbe dovuta primariamente ad

un'ipertrofia settale anteriore e meno comunemente ad un'ipertrofia diffusa che coinvolge, oltre al setto interventricolare, le pareti libere del ventricolo sinistro.

Può presentarsi rapidamente progressiva in età infantile o rimanere stabile per molti anni; se sintomatica in età pre-pubere, si associa ad elevata mortalità [Takahashi et al., 2005; Noonan, 2005].

Anche i difetti settali, sia quelli interatriali che quelli interventricolari, tra cui in particolar modo la pervietà del dotto arterioso di Botallo, rappresentano una possibile cardiopatia associata alla SN.

Alcuni recenti studi hanno documentato altri difetti strutturali, sebbene più rari. Un esempio è la dilatazione della radice dell'aorta, anomalia strutturale che sarebbe direttamente correlata alla patogenesi genetica della condizione. Tale alterazione molto spesso si mostra in associazione ad una displasia delle valvole mitrale, aortica o di entrambe.

Alterazioni genito-urinarie

Apparato escretore: circa il 10%-11% dei soggetti con sindrome di Noonan presenta all'esame ecografico malformazioni renali, ma con scarso significato patologico.

Descritti reni a ferro di cavallo, rene multicistico, cisti renale singola, agenesia renale monolaterale, dilatazioni della pelvi e doppio distretto ureterale.

Apparato genitale: frequentemente si osservano criptorchidismo (80%), uni- o bi-laterale, da porre anche in relazione a disfunzione delle cellule del Sertoli ed elevati livelli di FSH e LH sono riportati in maschi in età prepubere. Spesso necessitano di una correzione chirurgica, per il rischio di infertilità.

In entrambi i sessi lo sviluppo puberale può essere ritardato e associato a ridotto spurt accrescitivo; l'età media di sviluppo puberale

è 13.5-14.5 anni nei maschi e di 13-14 anni nelle femmine; spesso la pubertà può progredire in un breve tempo, inferiore ai 2 anni [Marcus et al., 2008; Shaw et al., 2006].

Nelle donne non sembrano riportate problematiche di fertilità, anche se in alcuni casi sono state riscontrate difficoltà di concepimento e problematiche ginecologiche durante la gravidanza.

Alterazioni coagulative

Nel 30%-65% dei casi di SN si evidenzia una diatesi emorragica [Witt et al., 1988; De Haan et al., 1988; Massarano et al., 1996].

Il tempo di tromboplastina parziale (PTT) è allungato in modo significativo in circa il 50% dei pazienti con Sindrome di Noonan. Le cause di questa condizione sono molteplici: la più comune è sicuramente un difetto strutturale a carico del fattore XI (25% pazienti SN), ma possono evidenziarsi anche difetti a carico del fattore II, del fattore VIII, IX e del fattore XII, malattia di Von Willebrand, trombocitopenia e difetti piastrinici funzionali.

La trombocitopenia può essere posta in relazione a ridotta sintesi di megacariociti e a splenomegalia (52%) isolata o associata ad epatomegalia.

Nella maggioranza dei casi, le manifestazioni cliniche sono modeste con epistassi, facilità a formare ematomi, menorragia. Emorragie severe si verificano nel 3% dei casi.

Uno studio del 2010 di Derbent et al. [2010], condotto su 30 pazienti con diagnosi clinica di SN, ha riscontrato bassi livelli di piastrine, ridotti valori dei fattori XI e XII e della proteina C, ma solo un paziente presentava segni clinici di coagulopatia.

Questo assetto coagulativo pertanto impone un attento screening laboratoristico nei pazienti con SN e scrupolose misure cautelative qualora tali pazienti dovessero sottoporsi ad interventi di natura chirurgica, anche minori.

Patologie linfoproliferative

La SN è associata ad aumentato rischio di neoplasie benigne e maligne, anche se non in modo significativo rispetto alla popolazione generale. Circa il 10% dei pazienti presenta disturbi mieloproliferativi, caratterizzati da leucocitosi con monocitosi, trombocitopenia ed epatosplenomegalia, che nella maggior parte dei casi si autolimitano [Choong et al., 1999]. Una bassa percentuale di pazienti sviluppa leucemia giovanile mielomonocitica. Questa predisposizione è stata associata ad uno stretto spettro di mutazioni di PTPN11, ma anche a mutazioni germinali di KRAS [Tartaglia et al., 2003]. Sono stati inoltre descritti casi di associazione tra SN e lesioni a cellule giganti della mandibola e di altre strutture ossee, associate a mutazioni di PTPN11, SOS1, BRAF e MEK1 [Beneteau et al., 2009; Neumann et al., 2009]. Recentemente, Kratz et al. [2011] ha raccolto 1051 casi di soggetti SN descritti in letteratura dal 1937 al 2010, dei quali 8 soggetti avevano sviluppato neuroblastoma, 8 leucemia acuta linfoblastica, 6 glioma a basso grado e altri 6 rhabdomyosarcoma, stimando un rischio cumulativo di neoplasia pari a circa il 4% in soggetti Noonan dopo i 20 anni.

Alterazioni dell'autoimmunità

Le alterazioni dell'autoimmunità non sono manifestazioni frequenti nella Sindrome di Noonan e non è stata al momento formulata una precisa incidenza. La presenza di anticorpi antitiroide è in realtà frequente, ma non sempre in associazione ad ipotiroidismo e sono stati anche descritti casi di Lupus eritematoso sistemico [Alanay et al., 2004; Lopez-Rangel et al., 2005].

Un recentissimo lavoro di Quaia et al. [2012] condotto su 42 pazienti affetti da RASopatia, 38 dei quali con SN, ha osservato autoanticorpi nel 52% dei pazienti; il 14% dei casi presentava anche manifestazioni cliniche compatibili con patologia autoimmune (Lupus eritematoso

sistemico, tiroidite autoimmune, malattia celiaca, epatite autoimmune e vitiligine).

Problematiche neurologiche e psicologiche

Le alterazioni neurologiche e psicologiche nella SN sono molteplici e poco note.

Alcuni pazienti presentano anomalie cerebrali, quali alterazioni artero-venose, malformazione di Arnold-Chiari tipo 1 e idrocefalo.

Normalmente la circonferenza cranica è nei limiti di normalità, ma può anche esserci macrocefalia o microcefalia.

Alcuni studi mostrano che nel 13% dei casi si evidenziano crisi epilettiche e neuropatia periferica.

La maggior parte dei pazienti SN presentano una normale intelligenza, ma il Q.I è spesso rilevato a -1DS rispetto la popolazione generale (QI medio 85).

Ritardo mentale lieve è riportato nel 15%-35% dei casi; sono inoltre descritte aumentate difficoltà di apprendimento e dal 10% al 40% dei pazienti richiedono supporto scolastico.

Dal punto di vista psicomotorio, è riportato un generale ritardo nell'acquisizione delle prime tappe dello sviluppo, impaccio motorio e difficoltà di coordinazione; emotivamente possono presentare irritabilità, testardaggine, scarsa autostima, depressione; rilevate anche difficoltà di socializzazione e deficit dell'attenzione [Sharland et al., 1992; Duenas et al., 1973; Van Der Burgt et al., 1999; Lee et al., 2005]. In un recente studio [Alfieri et al., 2011] condotto su 20 soggetti con diagnosi molecolare di Sindrome di Noonan e Sindrome di Noonan con lentigini multiple (sindrome LEOPARD) è emersa un ridotta capacità di richiamo della memoria verbale a lungo termine ma memoria visuo-spaziale relativamente preservata. Infine, alcuni studi stanno affrontando il ruolo del pathway RAS-MAPK nello sviluppo di connessioni sinaptiche in diversi processi comportamentali (Fasano et al., 2011).

Caratteristiche dell'epoca prenatale

Il sospetto di Sindrome di Noonan in epoca prenatale, va avanzato in caso di riscontro di igroma cistico, ascite, idrope fetale, polidramnios, aumentata traslucenza nucale o cardiopatia congenita [Benacerraf et al., 1989; Schluter et al., 2005].

Pergament et al ha identificato 8 casi di soggetti con SN, su 120 feti euploidi, che presentavano aumentata traslucenza nucale e precedentemente Lee et al aveva riscontrato mutazioni di PTPN11 in 12 su 134 feti euploidi con anomalie ecografiche tipo aumentata traslucenza nucale, igroma cistico, idrope fetale [Pergament et al., 2011; Lee et al., 2009].

In un recente studio retrospettivo di Baldassare e collaboratori [2011] condotto su 47 soggetti affetti da Sindrome di Noonan con conferma molecolare, è riportata una prevalenza di polidramnios pari al 38.3% dei casi, di patologico triplo test o aumentata traslucenza nucale nel 36.4% e di idrotorace nel 10.6% dei soggetti SN. Solo l'8% dei pazienti affetti da cardiopatia era stato diagnosticato in epoca prenatale.

Difficoltà di alimentazione

Il 75% dei pazienti SN presentano difficoltà alimentari, soprattutto nei primi mesi di vita; segnalate difficoltà nella suzione (15%), vomito ricorrente (8%) e, in alcuni casi più gravi, difficoltà alimentari che richiedono l'utilizzo del sondino naso-gastrico in nati a termine per più di 2 settimane (24%).

Di comune riscontro il reflusso gastroesofageo e la malrotazione gastrica. In alcuni studi rilevata immaturità intestinale e alterazioni della motricità gastrointestinale. Nella maggior parte dei pazienti le difficoltà alimentari si risolvono a circa 18 mesi [Sharland et al., 1992; Shah et al., 1999].

Bassa statura

La bassa statura è una manifestazione molto comune della Sindrome di Noonan, riportata nel 50%-70% dei pazienti, ed è accompagnata da un ritardo variabile dell'età ossea (in media intorno ai 2 anni).

I neonati affetti dalla sindrome presentano generalmente peso e lunghezza adeguati, ma cominciano a decelerare, allontanandosi dal 3° percentile, già a partire dai primi tre mesi di vita. La statura definitiva media del soggetto maschio adulto è intorno a 162.5 cm, mentre nella femmina è di circa 153 cm; a tale proposito sono state elaborate delle curve di crescita specifiche per questa condizione.

La bassa statura in pazienti con SN viene molto spesso trattata con Ormone della Crescita ricombinante (GH), terapia che, oltre a richiedere precisi parametri auxologici per essere somministrata, necessita di un continuo monitoraggio clinico [Binder et al., 2005; Noonan et al., 2003; Noonan, 2006].

EZIOPATOGENESI

La Sindrome di Noonan è trasmessa con modalità autosomica dominante ma il 30%-50% dei casi deriva da una mutazione de novo.

PTPN11

Il principale gene-malattia associato nel 50% dei casi alla Sindrome di Noonan, identificato nel 2001 con approccio posizionale del gene candidato, è stato *PTPN11* (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11) (12q24.1) [Tartaglia et al., 2001], codificante la proteina SHP-2 (Src homology region 2-domain phosphatase 2) proteina citoplasmatica con dominio SH2 che agisce come trasduttore

di segnali intracellulari, modulando positivamente l'attività di RAS, legandosi e defosforilando le fosfotirosine.

La struttura di SHP-2 è costituita da più domini: 2 domini N-terminali Src-homology in tandem (N-SH2 e C-SH2), un dominio catalitico PTP (protein tyrosine phosphatase) e uno C-terminale, di non chiara funzione.

SHP-2 inattivato si trova in una conformazione chiusa; la sua attivazione catalitica richiede la distruzione dell'interazione N-SH2/PTP (il dominio N-SH2 interagisce con il dominio PTP nella conformazione inattiva, bloccando il sito catalitico) [Hof et al., 1998]. Attualmente sono state descritte più di 40 mutazioni spesso missense del gene PTPN11 associate a Sindrome di Noonan, la maggior parte delle quali riguarda i domini N-SH2 (> 45%) e PTP (> 45%); le mutazioni agiscono con diversi meccanismi: alcune coinvolgono residui amminoacidici del legame N-SH2/PTP che normalmente stabilizza SH2 nella forma cataliticamente inattiva, e causano up-regolazione di SH2, alterando lo switch tra forma attiva e inattiva, spostando l'equilibrio verso la forma attiva; altre coinvolgono siti di legame N-SH2 e il dominio C determinando gain of function aumentando l'affinità di legame, interferendo sull'affinità di legame con altre proteine implicate nella trasduzione o alterando la flessibilità di N-SH2 e quindi il suo legame con PTP.

Questo determina persistente tirosino-fosforilazione di SHP2 (JACK2 e STAT5B), ovvero stabilizzazione cronica della conformazione attiva [Keilhack et al., 2005; Tartaglia et al., 2006].

Tra le varie attività espletate, SHP2 regola negativamente la trasmissione del segnale GH recettore (GHR)/JACK2 e STAT5B e la cascata RAS/MAPK attraverso l'interazione tra il dominio N-SH2 e il dominio PTP che ha come effetto l'autoinibizione di quest'ultimo.

Sia il GH che l'IGF1, infatti, esercitano la loro azione legandosi a specifici recettori transmembrana che, attraverso una cascata di segnali biochimici intracellulari, fosforilano alcuni residui tirosinici localizzati nel dominio intracellulare della proteina SHP-2; pertanto la

defosforilazione dei residui tirosinici, secondaria al guadagno di funzione di SHP2, induce l'interruzione di questa fisiologica cascata di segnali.

Correlazione genotipo-fenotipo

Soggetti affetti da SN con mutazione di PTPN11 presentano con maggior frequenza stenosi della valvola polmonare e difetti interatriali, piuttosto che miocardiopatia ipertrofica [Tartaglia et al., 2002]. Altri aspetti tipici sono la bassa statura, le deformità toraciche e il fenotipo facciale. Rispetto ad altri genotipi Noonan, pazienti con mutazione di PTPN11 hanno maggior incidenza di diatesi emorragica [Jongmans et al., 2004; Zenker et al., 2004].

SOS1

SOS1 (son of sevenless homolog 1) (2p21) è il secondo gene per frequenza mutato in pazienti affetti da SN (10%).

Codifica per una guanine-nucleotide exchange factors (GEF) multi dominio, che catalizza il distacco di GDP da RAS, facilitando la conversione di RAS nella forma attiva legata a GTP.

La porzione N-terminale contiene un dominio istone (HD), seguito da un dominio di omologia Dbl (DH) e da un dominio di omologia di pleckstrin (PH); la porzione C-terminale contiene in dominio REM (RAS exchanger motif) e il dominio Cdc25, ed infine il sito di riconoscimento per SH3.

La maggior parte delle mutazioni sono missense e possono coinvolgere diversi domini. Il 50% delle mutazioni coinvolge residui localizzati sull'elica che connette il dominio PH e il dominio REM con sostituzioni nel 30% dei casi del residuo Arg552; una seconda mutazione è stata individuata all'interno del dominio PH (residui 432-434) ed una terza nella regione di interazione tra il dominio DH

Thr266 e Met269) e REM (Trp729 e Ile733); una singola mutazione amminoacidica nel dominio Cdc25 è responsabile di circa il 10% dei difetti. La maggior parte di queste regioni mutate contribuisce al mantenimento della struttura cataliticamente autoinibita.

Diversi studi hanno dimostrato che mutazioni di SOS1 in pazienti SN, determinano un guadagno di funzione e potenzia l'attivazione di RASed ERK [Tartaglia et al., 2007; Roberts et al., 2007].

Correlazione genotipo-fenotipo

Pazienti con mutazione SOS1 presentano generalmente un fenotipo caratterizzato da macrocefalia, anomalie ectodermiche (cheratosi pilare, capelli ricci, sparsi, sopracciglia sparse) e minor incidenza di bassa statura e deficit cognitivo [Tartaglia et al., 2007; Lepri et al., 2011].

KRAS e NRAS

KRAS (12p12.1) e NRAS (1p13.2) sono GTPasi monomeriche che utilizzano lo switch GDP/GTP per controllare il flusso di segnale intracellulare. Presentano alta affinità per GDP e GTP, bassa attività GTPasica e passano da uno stato inattivo legato a GDP ad uno attivo legato a GTP. Sono attivate da GEF, come SOS1 che facilita il rilascio di GDP, e inattivate da GAPs, che stimolano l'attività intrinseca GTPasica [Mitin et al., 2005].

Mutazioni di KRAS sono state riscontrate in una bassa percentuale di pazienti SN o CFC (< 2%-5%). Recentemente 2 mutazioni missense di NRAS (Trh50Ile e Gly60Glu) sono state descritte in un limitato gruppo di soggetti SN (<0.5%) [Cirstea et al., 2010].

Correlazione genotipo-fenotipo

Mutazioni di KRAS nella SN correlano con fenotipo variabile ma frequentemente severo, con coinvolgimento significativo dell'aspetto cognitivo. Il limitato numero di pazienti SN portatori di mutazione di NRAS non permettono, al momento, di codificare uno specifico fenotipo.

RAF1 e BRAF

RAF1 (3p25) e BRAF (7q34) [Pandit et al., 2007] appartengono ad una piccola famiglia di serin-treonin kinasi che agiscono come effettori di RAS; fosforilano e attivano MEK1 e MEK2, kinasi che promuovono l'attivazione di ERK1 ed ERK2; in specifico BRAF ha l'attività MEK-kinasi più elevata.

Mutazioni di RAF1 sono state individuate nel 5%-15% dei pazienti SN (e in 2 pazienti affetti da Sindrome di Noonan con lentigini multiple [Pandit et al., 2007]) e possono riguardare 3 regioni della proteina: il primo gruppo (70% delle mutazioni di RAF) coinvolge il dominio N-terminale, il secondo (15%) coinvolge residui della porzione di attivazione del dominio kinasi, il terzo (15%) riguarda 2 residui adiacenti localizzati nella porzione C-terminale; le mutazioni N-terminali e C-terminali determinano generalmente un'amplificazione dell'attività kinasica, aumentando la trasduzione del segnale, mentre quelle che coinvolgono il dominio interno di attivazione riducono l'attività kinasi e alterano la trasduzione del segnale. Mutazioni missense di BRAF sono state invece individuate solo nel 2% dei casi di SN (primo gene identificato per la CFC) e al momento sono più di 40; coinvolgono il dominio ricco in cisteina, la porzione amino-terminale e il segmento di attivazione del dominio kinasico [Leicht et al., 2007].

Correlazione genotipo-fenotipo

Soggetti RAF1 positivi presentano un'aumentata incidenza di miocardiopatia ipertrofica (75%) rispetto alla restante popolazione SN (18%) [Pandit et al., 2007]. Inoltre sono maggiormente predisposti a presentare anomalie cutanee da iperpigmentazione (nevi, lentiggini, MCL).

Mutazioni di BRAF in SN correlano con ritardo di crescita neonatale, difficoltà alimentari, ipotonia, anomalie scheletriche, bassa statura, e in minor frequenza cardiopatia (meno severa che nella CFC) e alterazioni cutanee come nevi e lentiggini scure. Il fenotipo facciale si caratterizza per dolicocefalia, ipertelorismo e orecchie bassoimpiantate con elice abbondante [Sarkozy et al., 2009].

MEK1

MEK1 (15q22.31) appartiene ad una famiglia di protein-kinasi che fosforilano le proteine ERK a livello dei residui serin/treonin e tirosinici. MEK1 e MEK2, correlati funzionalmente, agiscono come efettori delle proteine RAF. Mutazioni missenso di MEK1 sono state descritte in 3 soggetti con fenotipo Noonan (4.3%) [Nava et al., 2007]. Mutazioni di questi geni sono maggiormente correlate alla Sindrome CFC (20%).

Correlazione genotipo-fenotipo

Soggetti MEK1 sembrano presentare un fenotipo mild, con coinvolgimento limitato delle funzioni cognitive. Saranno necessari gruppi più ampi di pazienti mutati per poter definire un fenotipo più specifico.

RIT1

Nel 2013 Aoki et al. ha identificato nove differenti mutazioni missenso nel gene RIT1, che codifica per una proteina della sottofamiglia RAS, in 17 su 180 individui (9%) con segni clinici riferibili a sindrome di Noonan, in assenza di rilievo di mutazioni nei noti geni Noonan-correlati, dimostrando che mutazioni gain of function di questo gene correlano con tale condizione. Successivamente sono stati descritti altri pazienti con mutazioni di RIT1, confermando il ruolo patogenetico di tale gene nella sindrome di Noonan [Koenighofer et al., 2015; Gos et al., 2014; Chen PC et al., 2014].

Correlazione genotipo-fenotipo

Pazienti RIT1-positivi presentano segni fenotipici e clinici riferibili a sindrome di Noonan, quali caratteristiche distintive del volto, bassa statura, difetti cardiaci congeniti. In particolare, il 70% dei soggetti positivi alla mutazione hanno mostrato segni di cardiomiopatia ipertrofica [Aoki et al., 2013].

Koenighofer et al. [2015] ha inoltre descritto recentemente un paziente con mutazione in RIT1, segni fenotipici riferibili a sindrome di Noonan, DIV multipli, stenosi della valvola polmonare, cardiopatia ipertrofica concentrica e linfedema significativo degli arti inferiori e dei genitali. Ulteriori studi saranno necessari per meglio definire tale correlazione.

SOS2

Recentemente, è stata descritta la mutazione del gene SOS2, omologo al 70% con SOS1, associata a pazienti affetti da sindrome di Noonan con particolare coinvolgimento ectodermico, in una coorte di 50 pazienti brasiliani, mediante l'utilizzo del *whole exome sequencing*,

ipotizzando un prevalenza del 3% [Yamamoto et al., 2015]. Tale dato è stato sostanzialmente confermato anche da Cordeddu et al. [2015]. Le mutazioni di SOS2 ad oggi descritte incrementano la trasduzione del segnale da RAS ad ERK e coinvolgono solo il dominio DH (Dbl homology (DH) domain).

Correlazione genotipo-fenotipo

I pazienti con mutazione in SOS2 ad oggi descritti in letteratura [Yamamoto et al., 2015] presentano soprattutto segni di interessamento cutaneo quali ulerythema ophryogenes, tipiche caratteristiche facciali riferibili a SN e coinvolgimento cardiaco. Nella coorte di Yamamoto et al. sono stati inoltre rilevati bassa statura e difficoltà di apprendimento, differentemente da quanto comunemente riportato in soggetti SOS2, mentre nei pazienti descritti da Cordeddu et al. [2015], non erano presenti bassa statura e coinvolgimento cognitivo, ma tipiche manifestazioni ectodermiche, ipotizzando un fenotipo sovrapponibile a quello manifestato da pazienti con mutazione in SOS1.

DIAGNOSI

La diagnosi di Sindrome di Noonan generalmente si basa sul rilievo degli aspetti clinici caratteristici della condizione; anche se la prevalenza dei segni fenotipici non è tuttora ben definita e il riscontro di determinati segni correla con l'età del paziente. Sono stati inoltre elaborati sistemi di calcolo, per guidare la diagnosi clinica [Van Der Burgt et al., 1994].

Test molecolari vengono successivamente utilizzati per confermare la diagnosi clinica. Alla luce della complessità del pathway RAS-MAPK e del costante incremento dei geni identificati correlati alla condizione, ulteriori geni Noonan potranno essere identificati in

futuro. Al momento, anche in caso di mancata identificazione di una specifica mutazione genica, non dovrà essere esclusa la Sindrome di Noonan in pazienti con caratteristiche cliniche corrispondenti.

1.4.2 SINDROME CARDIO-FACIO-CUTANEA

La Sindrome cardio-facio-cutanea (CFC) è una patologia rara, sporadica, che presenta alcune caratteristiche sovrapponibili alla Sindrome di Noonan, ma dalla quale si differenzia per il più severo coinvolgimento cognitivo e le anomalie ectodermiche.

Aspetti tipici della CFC sono il ritardo di crescita, le anomalie cardiache, il fenotipo facciale caratteristico, le anomalie cutanee, il ritardo di sviluppo psicomotorio di grado moderato-severo e alterazioni del tratto gastroenterico e del sistema nervoso centrale [Tartaglia et al., 2011; Roberts et al., 2006].

In letteratura sono descritti circa 100 casi, ma si stima che nel mondo ce ne siano circa 200-300, dato probabilmente sottostimati per la presenza di casi lievi non diagnosticati [Rauen, 2010]. Un dato recente stimerebbe l'incidenza di Sindrome CFC a 1:810.000 nati vivi [Abe et al., 2012].

CENNI STORICI

Reynolds et al. [1986] pubblicò per la prima volta nel 1986, 8 soggetti con le caratteristiche della sindrome CFC e nello stesso anno, Baraitser e Patton, descrissero la stessa condizione [Baraitser et al., 1986]. Negli anni successivi si è sviluppato un dibattito sulla natura di "singola entità" della CFC; l'eterogeneità della sindrome CFC si è chiarita con i più recenti studi di Rodriguez-Viciano et al e Niihori et al. [2006].

CARATTERISTICHE CLINICHE

Segni fenotipici

Cranio e volto: macrocefalia relativa, fronte alta, riduzione del diametro bitemporale, viso largo, lungo e grossolano (più evidente che nella SN ma meno che nella Sindrome di Costello).

Occhi: ipoplasia delle arcate sopracciliari, ipetelorismo, telecanto, rima palpebrale rivolta verso il basso, epicanto, ptosi, naso corto con radice insellata e nari antiverse, incisure del lobo dell'orecchio, orecchie basso-impiantate e retro-ruotate.

-Dal punto di vista funzionale, sono stati riportati strabismo (33%), nistagmo (4%), astigmatismo e miopia (31%); riportati inoltre casi di ipoplasia del nervo ottico, cataratta e cecità corticale [Roberts et al., 2006; Young et al., 1993].

Bocca: filtro profondo, labbro superiore ad arco di cupido, palato ogivale, micrognatia.

Orecchie: condotti uditivi esterni stretti. Riportate otiti medie ricorrenti.

Anomalie ectodermiche

Le anomalie ectodermiche nella CFC sono molteplici e coinvolgono [Roberts et al., 2006; Siegel et al., 2011]:

Cute: nevi (23%), xerosi cutanea, ipercheratosi di viso, braccia, arti, ipercheratosi palmo-plantare nelle aree di pressione (a differenza della Costello), ittiosi, keratosi pilare (80%), ulerythema ophryogenes (90%), eczema, emangiomi (26%), MCL, eritema [Siegel et al., 2011].

Capelli: radi, ricci, fini o spessi, lanosi o fragili; possono essere assenti ciglia e sopracciglia.

Unghie: distrofia ungueale con unghie piatte e larghe o crescita accelerata.

Malformazioni cardiache

Le malformazioni cardiache, riportate in letteratura nel 75% dei pazienti CFC, che ricorrono più frequentemente sono [Roberts et al., 2006]:

- stenosi della valvola polmonare (45%)
- difetto interatriale (23%)
- difetto interventricolare
- miocardiopatia ipertrofica (40%)
- anomalie valvolari (displasia mitralica, displasia tricuspidalica, valvola aortica bicuspidale)
- alterazioni del ritmo
- ipertensione polmonare primaria

L'incidenza di stenosi della valvola polmonare e miocardiopatia ipertrofica nella CFC sono sovrapponibili a quelle individuate nella Sindrome di Costello, mentre nella Sindrome di Noonan vi è una maggiore incidenza di stenosi della polmonare e inferiore incidenza di miocardiopatia ipertrofica.

Alterazioni scheletriche

Le anomalie scheletriche descritte nella Sindrome CFC sono [Armour et al., 2008]:

- pectus carenatum/excavatum (63%)
- scoliosi (33%)
- cifosi (23%)
- iperestensibilità delle articolazioni (63%)

- contratture articolari (19%)
- piede piatto
- clinodattilia
- sindattilia

Anche un recente studio di Reiker et al ha mostrato in 32 soggetti CFC alterazioni ortopediche quali piede piatto-valgo, contratture in flessione del ginocchio e del gomito, contratture e displasia dell'anca [2011].

Anomalie genito-urinarie:

Apparato escretore: descritte anomalie renali quali cisti renali e nefrocalcolosi [Herman et al., 2005]

Apparato genitale: sono stati osservati casi di anomalie uterine e/o della cervice uterina

Alterazioni del tratto gastroenterico

In epoca neonatale sono di frequente riscontro deficit di suzione, iperemesi, aspirazione, reflusso gastro-esofageo e disturbi della motilità gastrointestinale.

Questi problemi dell'alimentazione spesso richiedono la necessità di ricorrere a sondino naso-gastrico, gastrostomia o interventi chirurgici tipo funduplicatio sec. Nissen.

Sono stati anche descritti casi di ernia inguinale ed ombelicale, mal rotazione gastrica, stenosi anale, iperplasia antrale foveolare [Herman et al., 2005; McDaniel et al., 1997].

Caratteristiche dell'epoca prenatale

Nella maggior parte dei casi di CFC è presente polidramnios. Riportati casi di iperemesi gravidica e riduzione dei movimenti attivi fetali.

Neoplasie

Il rischio tumorale nella CFC potrebbe essere aumentato rispetto alla popolazione generale (rischio stimato intorno al 3.5%), ma dati esaustivi devono ancora essere elaborati.

In letteratura sono riportati casi di leucemia acuta linfoblastica, epatoblastoma, linfoma non-Hodgkin e linfoma a grandi cellule B [Niihori et al., 2006; Rauen et al., 2010; Al-Rahawan et al., 2007; Ohtake et al., 2010].

Sviluppo psicomotorio e anomalie del Sistema Nervoso Centrale

Il ritardo mentale o globale dello sviluppo è stato riportato nell'81% dei pazienti CFC [Kavamura et al., 2003]. Le disabilità intellettive possono variare da lievi a severe, anche se raramente il QI è nei limiti di normalità. Caratteristico è il ritardo del linguaggio.

Sono stati inoltre riportati convulsioni, alterazioni EEG-grafiche (ridotto voltaggio anteriore, alterazioni tipo punta-onda, aritmie generalizzate) [Yoon et al., 2007; Adachi et al., 2012], idrocefalo o dilatazione ventricolare, atrofia corticale, agenesia o ipoplasia del corpo calloso, ipoplasia del verme cerebellare, anomalie di mielinizzazione [Roberts et al., 2006]. L'esecuzione della RMN encefalo può rappresentare un elemento utile nella diagnosi e nella gestione del paziente affetto da CFC [Papadopoulou et al., 2011].

Bassa statura

Il ritardo di crescita si manifesta tipicamente dopo la nascita, in associazione all'ipotonia e al ritardo dello sviluppo psicomotorio.

L'iposomia è descritta nel 78% dei pazienti [Kavamura et al., 2003] e il peso progressivamente si porta al di sotto dei valori di normalità, in relazione alle difficoltà alimentari; l'età ossea è generalmenete ritardata.

In alcuni casi, sono stati riportati deficit di secrezione dell'ormone della crescita e pubertà precoce. La presenza di miocardiopatia ipertrofica è però controindicazione assoluta alla terapia con ormone della crescita.

EZIOPATOGENESI

La Sindrome CFC è in genere dovuta ad una mutazione *de novo* dominante; al momento sono 4 i geni associati nel 60%-90% dei casi alla CFC [Tydiman, 2009; Rodriguez-Viciano et al., 2006; Niihori et al., 2006]:

- BRAF (50%-60% dei casi)
- MEK1 e MEK2 (5%-10%)
- KRAS (<5%)

Correlazione genotipo-fenotipo

Soggetti con mutazione BRAF più comune p.Gln257Arg si caratterizzano per la facies caratteristica, la miopia, le anomalie muscolo scheletriche, la cardiopatia congenita, anomalie strutturali dell'encefalo e il lieve ritardo psicomotorio mentre pazienti con mutazione di BRAF p.Gly596Val presentano un fenotipo mild, in assenza di cardiopatia, anomalie neurologiche e gastrointestinali, normale accrescimento e sviluppo psicomotorio adeguato [Rodriguez-Viciano et al., 2006; Niihori et al., 2006].

Mutazioni di MEK1 e MEK2 sono maggiormente associate a keratosi pilare e nevi multipli [Siegel et al., 2011].

Un recente studio condotto su 186 pazienti (50 dei quali non precedentemente descritti in letteratura) con diagnosi molecolare di sindrome CFC, di cui 140 mutati per BRAF (75%) e 46 (25%) per MEK1 o MEK2, ha permesso di comparare soggetti BRAF positivi e pazienti MEK1/2 positivi. Dallo studio non sono state rilevate

differenze significative in merito al periodo prenatale e ai dati accrescitivi; la stenosi della valvola polmonare è risultata più frequente in mutazioni di BRAF mentre le disabilità cognitive, la miocardiopatia ipertrofica, le anomalie del nervo ottico, la cifosi, i capelli ricci o radi, alterazioni gastrointestinali, sono riscontrate meno frequenti, anche se non in modo significativo, in mutazioni di MEK [Allanson et al., 2011].

DIAGNOSI

Si basa sul riscontro delle caratteristiche cliniche specifiche della condizione e sulla conferma data dai test di genetica molecolare.

1.4.3 SINDROME DI COSTELLO

La sindrome di Costello [Tartaglia et al., 2011] è una condizione caratterizzata da ipercrescita prenatale seguita da ritardo di crescita postnatale, aspetto facciale grossolano, ritardo mentale, anomalie cardiache, scheletriche e cutanee e predisposizione a sviluppare neoplasie [Zampino et al., 1993; Hennekam, 2003; Gripp et al., 2011; Gripp, 2005].

Colpisce con egual frequenza entrambi i generi ed è ubiquitaria; al momento non è possibile una precisa stima della prevalenza, anche se un recente studio giapponese ha stimato una prevalenza pari a 1:290.000 nati vivi [Abe et al., 2012].

CENNI STORICI

Fu descritta per la prima volta nel 1971 da Jack Costello in 2 pazienti, il quale la caratterizzò ulteriormente nel 1977 come sindrome con ritardo mentale e papillomi nasali. La sua distinzione come entità nosologica fu delineata meglio solo dopo 20 anni da altri autori, quali Der Kaluostian et al. [1991] e Johnson et al. [1998].

CARATTERISTICHE CLINICHE

Segni fenotipici

Cranio e volto: macrocefalia relativa, aspetto grossolano del volto, fronte alta, naso piccolo con radice insellata e ampia con punta bulbosa, guance piene [Zenker, 2011].

Occhi: epicanto e telecanto; dal punto di vista funzionale strabismo, vizi di refrazione e astigmatismo.

Orecchie: basso-impiantate e retro-ruotate con lobi ipertrofici ed antero-posti.

Bocca: larga, tendenzialmente aperta, con labbra carnose e macroglossia.

Cute e annessi: cute lassa e vellutata, keratoderma palmo plantare, iperpigmentazione cutanea in circa il 50% dei pazienti, capelli generalmente ricci e setosi, radi (possono infoltirsi nel tempo e può esserci perdita prematura); unghie sottili con lenta crescita, con striature longitudinali fino a diventare distrofiche; acanthosis nigricans; papillomi del volto (naso e regione malare) e della regione perianale con età media di comparsa intorno a circa 10 anni [Siegel, 2011].

Malformazioni cardiache

Le anomalie cardiache sono riportate in circa 1/3 dei pazienti affetti da Sindrome di Costello.

Le anomalie di più frequente riscontro sono [Siwik, 1998; Lin et al., 2011]:

- Miocardiopatia ipertrofica (61%)
- Cardiopatie congenite (44%)
 - stenosi della valvola polmonare
 - difetti del setto interventricolare
 - difetti del setto interatriale
 - prolasso della valvola mitrale
 - forame ovale pervio
- Anomalie del ritmo
 - Tachicardia atriale (48%)

La cardiomiopatia ipertrofica interessa generalmente il ventricolo sinistro, ma può coinvolgerli anche entrambi. Se si considera l'ipertrofia settale come quadro lieve o iniziale di cardiomiopatia, l'incidenza di coinvolgimento cardiaco sale al 90% [Zampino et al., 2007]: la cardiomiopatia più frequentemente descritta è quella di tipo ostruttivo del ventricolo sinistro, ma è stata riportata anche quella di tipo restrittivo; la miocardiopatia probabilmente è dovuta a progressiva disorganizzazione delle fibre miocardiche. I disturbi del ritmo possono essere presenti anche in epoca prenatale (tachicardia sopraventricolare, fibrillazione atriale, battiti ectopici).

L'associazione di cardiomiopatia ipertrofica ed alterazioni del ritmo di conduzione aggrava la prognosi, incrementando il rischio di eventi cardiaci improvvisi.

Alterazioni scheletriche

Le manifestazioni ortopediche più frequenti nella sindrome di Costello includono [Stevenson et al., 2011]:

- Cifosi
- Scoliosi
- Pectus excavatum o carenatum
- Aumentato diametro antero-posteriore del torace

- Sublussazione dell'anca
- Accorciamento e ispessimento del tendine di Achille (50%-70%)
- Lassità legamentosa
- Anomalia della mani (deviazione ulnare di dita e polsi con avambraccio flessa)
- Osteopenia/osteoporosi [White et al., 2005]

Alterazioni del tratto gastroenterico

I problemi di suzione e di deglutizione, già presenti in epoca prenatale come dimostra il riscontro di polidramnios, sono importanti e si manifestano nel mancato incremento ponderale fino a determinare un quadro simile alla malnutrizione proteico-calorica (fase marasmica); possono anche verificarsi crisi ipoglicemiche. Spesso sono presenti reflusso gastro-esofageo e stenosi ipertrofica del piloro [Gripp et al., 2008]. Le difficoltà alimentari persistono generalmente fino ai 2-4 anni; dopo questa età si assiste anche alla ripresa dell'incremento ponderale.

Caratteristiche dell'epoca prenatale

Nel periodo prenatale, nella sindrome di Costello, è pressoché costante (>90%) il rilievo di polidramnios a partire dalle 20-28 settimane di età gestazionale, probabilmente dovuto al deficit di suzione. Raro il riscontro di idrope fetale o di altre anomalie visibili eco graficamente. Il riscontro in epoca prenatale di polidramnios associato ad aumentata traslucenza nucale, ridotta lunghezza di femori ed omeri, deviazione ulnare delle dita dei piedi, tachicardia fetale deve far sospettare la diagnosi di sindrome di Costello [Lin et al., 2009].

Neoplasie

Nella sindrome di Costello è riportata un'aumentata incidenza di tumori solidi che oscilla dall'11% al 20%. In età infantile di più frequente riscontro è il rhabdomyosarcoma, descritto in 13 casi in letteratura [Gripp, 2005] seguito dal ganglioneuroblastoma (surrenalico e mediastinico) [Zampino et al., 1993; Moroni et al., 2000] e dal neuroblastoma, mentre dopo la pubertà aumenta il rischio di carcinoma a cellule transizionali della vescica [Franceschini et al., 1999; Gripp et al., 2000; Urakami et al., 2002].

Sono stati inoltre descritti epiteloma [Martin et al., 1991], displasia osteofibrosa in corso di terapia con ormone della crescita [Komoda et al., 2003] e schwannoma vestibolare. Non sono invece stati descritti casi di degenerazione neoplastica delle lesioni papillomatose.

Anomalie del Sistema Nervoso Centrale e Sviluppo psicomotorio

Le anomalie neurologiche rilevate nella sindrome di Costello comprendono [Gripp et al., 2010]:

- Dilatazione dei ventricoli cerebrali (50% dei casi)
- Idrocefalo (può richiedere derivazione ventricolo-peritoneale: 25%)
- Midollo ancorato
- Malformazione di Arnold Chiari di tipo 1 (32%)
- Anomalie EEG-grafiche (33% circa) - Epilessia (20%)

La malformazione di Arnold Chiari tipo 1 può essere evolutiva ed associarsi a siringomielia.

Riportati anche casi di atrofia cerebrale diffusa o localizzata generalmente nel lobo frontale.

Sono state inoltre descritte crisi convulsive, anche in assenza di anomalie strutturali cerebrali, quali crisi tonico-cloniche generalizzate, epilessia focale, spasmi infantili con ipsaritmia, sindrome di Lennox Gastaut secondaria a sindrome di West [Delrue et al., 2003].

Un recente studio [Dileone et al., 2012] condotto su 6 pazienti Costello ha delineato la distonia come un nuova possibile

caratteristica nello spettro clinico della sindrome. Sono inoltre frequenti le apnee ostruttive del sonno [Della Marca et al., 2006], probabilmente anche da associare a macroglossia, lassità dei tessuti laringei e alla malformazione di Arnold Chiari.

Il ritardo mentale è di grado variabile, da lieve a moderato con QI medio pari a 58 (range 43-77) e le tappe dello sviluppo psicomotorio sono acquisite con ritardo (controllo del capo 9 mesi, posizione seduta 12 mesi, deambulazione autonoma 24 mesi).

La comunicazione verbale inizia intorno ai 24 mesi e l'arricchimento del vocabolario migliora fino dopo l'adolescenza. Nei primi anni di vita, i bambini affetti da sindrome di Costello possono mostrare irritabilità, ipersensibilità agli stimoli tattili e uditivi e difficoltà relazionali, che migliorano dopo i 4 anni, con sviluppo di personalità amichevole. L'ansia di separazione è riportata in circa il 39% dei soggetti, soprattutto maschi [Axelrad et al., 2011].

Bassa statura

La statura di soggetti affetti da sindrome di Costello è circa -4DS rispetto la popolazione generale, raggiungendo i 138 cm in età adulta (range 118-148 cm) [Van Eeghen et al., 1999]; alcuni presentano deficit di secrezione di ormone della crescita e sono stati posti in terapia sostitutiva con parziale beneficio [Stein et al., 2004] ma il rischio di cardiomiopatia ipertrofica e di sviluppo neoplastico pongono interrogativi sulla possibilità di effettuare tale terapia.

In letteratura sono stati infatti descritti 2 casi di sviluppo di neoplasia, carcinoma vescicale e rhabdomyosarcoma, dopo terapia con ormone della crescita [Gripp et al., 2000; Kerr et al., 2003], anche se il ruolo di questa terapia nello sviluppo delle neoplasie nella sindrome di Costello è da chiarire. Può inoltre verificarsi ritardo puberale.

EZIOPATOGENESI

Nel 2005 sono state identificate mutazioni missenso germinali in HRAS causativi della sindrome di Costello nell'80%-90% dei casi [Aoki et al., 2005]. La maggior parte delle mutazioni coinvolge la glicina in posizione 12 o 13; circa l'85% presenta la sostituzione aminoacidica p.Gly12Ser (vs 5% della stessa mutazione legata al cancro), seguita dalla sostituzione p.Gly12Ala (7.2%); seguono p.Gly12Cys e p.Gly12Val che rappresentano solo il 2% ciascuno delle sostituzioni nella sindrome di Costello (vs 45% riscontrata nei tumori).

Correlazione genotipo-fenotipo

Il rischio neoplastico è risultato più elevato in soggetti con mutazione p.Gly12Ala (57%) rispetto ad individui con mutazione p.Gly12Ser (7%) e nessun soggetto con mutazione p.Gly12Cys ha sviluppato un tumore [Gripp et al., 2011; Kerr et al., 2006; Estep et al., 2006]. Alle mutazioni p.Gly12Asp e p.Gly12Cys è associato un fenotipo neonatale più severo [Lo et al., 2008], mentre un fenotipo più mild è stato descritto nelle mutazioni p.Thr58Ile e p.Ala146Val [Gripp et al., 2008]. Papillomi e tachicardia atriale multifocale non sono stati riscontrati in pazienti p.Gly13Cys, che oltretutto mostrano minor incidenza di iposomia. La recente review del 2011 di Gripp et al condotta su 12 soggetti Costello, ha inoltre caratterizzato in presenza della mutazione p.Gly13Cys un fenotipo tipico che oltre ad avere caratteristiche usuali della condizione presenta anche ciglia lunghe che richiedono il taglio e loose anagen hair [Gripp et al., 2011].

DIAGNOSI

La diagnosi si basa sul riscontro delle caratteristiche cliniche tipiche e viene confermata dall'indagine molecolare, mediante il

sequenziamento di HRAS. Al momento non sono stati elaborati criteri diagnostici ma sono disponibili linee guida elaborati da esperti [Gripp et al., 2011].

La diagnosi clinica differenziale con altre condizioni del pathway RAS-MAPK deve essere presa in considerazione in assenza di mutazioni di HRAS.

1.4.4 SINDROME DI NOONAN CON LENTIGGINI MULTIPLE (SINDROME LEOPARD)

E' una sindrome caratterizzata da anomalie congenite multiple, ereditata con modalità autosomica dominante. L'acronimo LEOPARD veniva precedentemente utilizzato per descrivere le caratteristiche principali della condizione: **L**entiggini, anomalie **E**CG, ipertelorismo **O**culare, stenosi **P**olmonare, **A**nomalie dei genitali, **R**itardo di crescita e sordità neurosensoriale (**D**eafness).

Altri aspetti frequenti nella sindrome sono:

- Deficit cognitivo di grado variabile
- Anomalie scheletriche
- Cardiomiopatia ipertrofica

Le caratteristiche facciali sono simili a quelle della sindrome di Noonan, seppur più sfumate [Tartaglia et al., 2011].

In letteratura sono descritti circa 200 soggetti affetti da Sindrome di Noonan con lentigginini multiple, ma l'effettiva incidenza non è nota [Sarkozy et al., 2008].

CENNI STORICI

La prima paziente affetta da sindrome di Noonan con lentigginini multiple (sindrome LEOPARD) fu descritta nel 1936 e presentava lentigginini multiple, ipertelorismo, pectus carinatum e prognatismo

[Zeisler, 1936]. Fu indicata con l'acronimo LEOPARD nel 1969 da Gorlin RJ et al. e, nel 1976, Voron et al. proposero dei criteri diagnostici per identificare la condizione.

Lo sviluppo delle indagini molecolari ne ha permesso una successiva caratterizzazione anche dal punto di vista genetico.

CARATTERISTICHE CLINICHE

Segni fenotipici

Cranio, collo e volto: viso a triangolo invertito, collo corto con cute abbondante sulla nuca e basso-impianto dei capelli posteriormente, radice del naso piatta.

Occhi: rima oculare rivolta verso il basso, ipertelorsimo, ptosi palpebrale.

Orecchie: basso-impiantate e retro-ruotate, elice abbondante. Dal punto di vista funzionale riportata in circa il 20% dei casi ipoacusia neurosensoriale.

Cute e annessi: lentigini multiple, macchie marroni-nere, localizzate soprattutto al volto, al collo e alla porzione del tronco, senza interessamento della mucosa. Le lentigini generalmente non sono presenti fino ai 4-5 anni di età, fino a diventare migliaia in epoca puberale [Coppin et al., 1997]. Sono state descritte MCL in circa il 70-80% dei soggetti [Digilio et al., 2006] che generalmente precedono la comparsa delle lentigini essendo presenti già nel primo mese di vita; riportata iperelasticità cutanea.

Malformazioni cardiache

Circa il 50% dei soggetti con sindrome di Noonan con lentiggini multiple (sindrome LEOPARD) presenta un coinvolgimento cardiaco; le anomalie sono sovrapponibili a quelle riscontrate nella sindrome di Noonan, ma ricorrono con diversa frequenza [Limongelli et al., 2007]:

- Cardiomiopatia ipertrofica (70%)
- Stenosi della valvola polmonare (25%)
- Alterazioni ECG (23%)
- Prolasso della valvola mitrale e altre anomalie (42%)

La cardiomiopatia ipertrofica, solitamente asimmetrica che coinvolge il ventricolo sinistro, si manifesta nell'età infantile e generalmente ha carattere progressivo e spesso si associa ad onde q (19%), allungamento del QTc (23%) e anomalie della ripolarizzazione (42%). Difetti di conduzione sono presenti nel 23% dei casi e anomalie dell'onda P nel 19%.

Riportati casi di morte improvvisa in soggetti con sindrome di Noonan e lentiggini multiple con cardiomiopatia ipertrofica.

Alterazioni scheletriche

Le anomalie riportate sono soprattutto deformità del torace, riportate nel 75% dei neonati [Digilio et al., 2006]:

- torace largo
- pectus excavatum e carinatum

Con minor frequenza [Sarkozy et al., 2008] descritti:

- Prognatismo
- Scapole alate, scoliosi
- Ipersensibilità articolare.

Anomalie genito-urinarie:

Criptorchidismo unilaterale o bilaterale è presente in circa 1/3 dei soggetti maschi; sono inoltre stati riscontrati con minor frequenza

ipospadia, anomalie delle vie urinarie come rene a ferro di cavallo. Nelle femmine descritte ipoplasia ovarica e ritardo puberale [Sarkozy et al., 2008; Digilio et al., 2006].

Caratteristiche dell'epoca prenatale

La sindrome di Noonan con lentiggini multiple deve essere sospettata in epoca prenatale in caso di feto con cardiomiopatia ipertrofica e cariotipo normale.

La diagnosi differenziale in epoca prenatale con la sindrome di Noonan può risultare molto difficile.

Neoplasie

In un limitato numero di pazienti sono stati descritti mielodisplasia, leucemia mieloide acuta, neuroblastoma e tumore corneale [Ucar et al., 2007; Merks et al., 2005; Choi et al., 2003]. Descritto inoltre un caso di tumore a cellule multiple granulari in soggetto con sindrome di Noonan e lentiggini multiple con mutazione PTPN11 T468M [Schrader et al., 2009].

Anomalie del Sistema Nervoso Centrale e Sviluppo psicomotorio

Nei neonati è di frequente riscontro l'ipotonia e può esserci ritardo dello sviluppo psicomotorio [Digilio et al., 2006].

In circa il 30% dei pazienti si osservano disabilità intellettive di livello lieve, mentre il ritardo mentale è raro [Sarkozy et al., 2008].

Bassa statura

Il ritardo di crescita post-natale è presente in meno del 50% dei soggetti con sindrome di Noonan e lentiggini multiple. Nel 25% dei casi la statura è inferiore al 3th percentile e l'85% dei pazienti in età

adulta presenta statura al di sotto del 25th percentile per la popolazione generale. Il peso alla nascita è solitamente normale ma può superare il 97th percentile [Sarkozy et al., 2008].

EZIOPATOGENESI

I geni mutati individuati come responsabili della sindrome di LEOPARD sono:

- PTPN11 (90%)
- RAF1 (<5%) [Pandit et al., 2007]
- BRAF (<5%) [Sarkozy et al., 2009]

Le 11 mutazioni missense identificate a carico di PTPN11 coinvolgono soprattutto gli esoni 7, 12 e 13 (Tyr279Cys/Ser, Ala461Thr, Gly464Ala, Thr468Met/Pro, Arg498Trp/Leu, Gln506Pro, Gln510Glu/Gly); in particolare le mutazioni Tyr279Cys e Thr468Met ricorrono in circa il 65% dei casi.

Gli esoni coinvolti nelle mutazioni di RAF1 sono soprattutto il 6, il 13 e il 16.

Correlazione genotipo-fenotipo

Nei soggetti con sindrome di Noonan e lentiggini multiple, PTPN11 mutati è stata riscontrata un'associazione tra il coinvolgimento degli esoni 7 e 12 e la cardiomiopatia ipertrofica e tra l'esone 8 e la stenosi polmonare [Sarkozy et al., 2003], mentre il coinvolgimento dell'esone 13 correla con lo sviluppo di una severa cardiomiopatia ipertrofica ostruttiva bilaterale [Takahashi et al., 2005]. Pazienti senza mutazione di PTPN11 hanno maggior incidenza di alterazioni ECG grafiche ed ipertrofia del ventricolo sinistro [Limongelli et al., 2007]. La mutazione Thr468 è meno frequentemente associata a bassa statura (26% vs. 47%) e a sordità (24% vs. 9%) [Sarkozy et al., 2004].

Le 2 mutazioni di RAF1 osservate sono strettamente correlate allo sviluppo di cardiomiopatia ipertrofica [Pandit et al., 2007] e la mutazione p.Ser257Leu si associa anche a sindrome di Noonan. Recenti studi hanno sperimentato l'utilizzo della ciclosporina [Perundurairi et al., 2011] o della rapamicina [Marin et al., 2011] nel trattamento della cardiomiopatia ipertrofica indotta da RAF1. Il caso riportato da Koudova et al in cui è mutato BRAF non presenta coinvolgimento cognitivo [2009].

DIAGNOSI

La diagnosi di sindrome di Noonan con lentiggini multiple deve essere sospettata, secondo i criteri di Voron et al. [1976], in presenza di lentiggini e altri 2 criteri maggiori; in assenza della lentiginosi, la diagnosi può essere avanzata se sono presenti 3 criteri clinici e storia di malattia in un familiare stretto. La diagnosi nel I mese di vita può essere effettuata sulla base del riscontro di cardiomiopatia congenita, caratteristico aspetto facciale e MCL [Digilio et al., 2006]. Le indagini molecolari possono confermare il sospetto clinico. Importante porre attenzione nel formulare la diagnosi differenziale con le altre condizioni del pathway RAS-MAPK, in particolare con la sindrome di Noonan e la Neurofibromatosi.

1.4.5 SINDROME MAZZANTI

La sindrome Mazzanti, precedentemente denominata Sindrome Noonan-like con loose anagen hair (NS/LAH), è caratterizzata da aspetti fenotipici riconducibili alla sindrome di Noonan in associazione ad aspetti clinici tipici, quali [Mazzanti et al., 2006; Cordeddu et al., 2009]:

- Fenotipo facciale Noonan-like
- Loose anagen hair

- Cute scura, iperpigmentata
- Ritardo di crescita associato a deficit di secrezione di ormone della crescita (GH)
- Deficit cognitivo
- Fenotipo comportamentale tipico
- Voce rauca ed ipernasale

CENNI STORICI

Nel 1991 e nel 1997 Tosti et al riportò 2 casi di bambini con loose anagen hair in associazione alla sindrome di Noonan.

Nel 2003 Mazzanti et al rivalutò questi 2 pazienti e ne descrisse un terzo con le stesse caratteristiche di bassa statura, deficit di ormone della crescita, fenotipo facciale tipico, disturbi comportamentali, cardiopatia e anomalie ectodermiche e ipotizzò che si trattasse di un disturbo dello sviluppo distinto dalla sindrome di Noonan.

Nel 2009, infine, è stata identificata la mutazione a carico di SHOC2 responsabile della sindrome Mazzanti [Cordeddu et al., 2009].

CARATTERISTICHE CLINICHE

Segni fenotipici

Cranio, collo e volto: macrocefalia, fronte alta, collo corto e largo.

Occhi: ipertelorismo, ptosi palpebrale, epicanto.

Orecchie: orecchie basso-impiantate, retro-ruotate.

Cute e annessi: cute scura, iperpigmentata, associata ad eczema o ittiosi con frequente prurito, capelli facilmente estraibili, sottili, fini, con crescita lenta nella fase anagen e privi di cuticola.

La diagnosi di LAH syndrome si effettua mediante hair pull-test con l'estrazione indolore di almeno 10 LAH e al tricogramma si rilevano più del 70%-100% di radici tipiche; generalmente migliorano nell'adolescenza; inoltre sono presenti sopracciglia sparse e unghia sottili o distrofiche.

Torace: pectus carenatum ed excavatum, teletelia

Malformazioni cardiache

Nella maggior parte dei pazienti sono state osservate:

- Displasia della valvola mitrale
- Difetti settali

Anomalie del Sistema Nervoso Centrale e Sviluppo psicomotorio

Soggetti affetti da sindrome Mazzanti presentano un fenotipo cognitivo-comportamentale caratterizzato da lieve ritardo dello sviluppo psicomotorio, irritabilità e disturbo dell'attenzione, che migliora nel tempo. Sotto il profilo relazionale ed affettivo sembrano mostrare un'attitudine ottimistica e buon livello di autostima [Mazzanti et al., 2006].

Sotto il profilo organico, descritte anomalie strutturali quali ampliamento degli spazi anatomici contenenti liquido cefalo-rachidiano [Mazzanti et al., 2006].

Recentemente è stato inoltre descritto un paziente affetto da sindrome Mazzanti con una complessa sintomatologia neurologica caratterizzata da tic vocali e motori ed epilessia associata ad alterazioni EEG, ipoplasia del corpo calloso e atrofia sostanza bianca [Capalbo et al., 2012].

Bassa statura

La bassa statura in soggetti affetti da sindrome Mazzanti è riportata in associazione a deficit di secrezione di ormone della crescita [Mazzanti et al., 2006; Cordeddu et al., 2009; Capalbo et al., 2012].

In un nostro recente studio [Mazzanti et al., 2013], 7 pazienti affetti da sindrome Mazzanti mostravano statura pari a -3.45 ± 0.82 SDS, rispetto ai parametri di riferimento per la popolazione italiana e al target parentale (TH), bassi livelli di IGF-1 (2.63 ± 0.51 DS) e deficit secretivo di GH ai test di stimolo farmacologici. Inoltre l'andamento puberale osservato è stato variabile, mostrando una pubertà prolungata e ritardata oppure una progressione rapida, con secondario coinvolgimento della statura finale (SF).

EZIOPATOGENESI

La sindrome Mazzanti è una condizione geneticamente omogena e distinta, dovuta a mutazione del gene SHOC2. Una singola mutazione a carico di SHOC2, c.4A>G, che determina la sostituzione p.Ser2Gly, è responsabile della totalità dei casi [Cordeddu et al., 2009].

SHOC2

Il gene SHOC2 codifica per una proteina che modula positivamente la trasduzione del segnale nel pathway RAS-MAPK.

SHOC2 è una proteina ampiamente espressa costituita quasi interamente da ripetizioni ricche in leucina e da sequenze N-terminali ricche in lisina.

La sostituzione amminoacidica identificata (c.4A>G, p.Ser2Gly) determina la N-miristoilazione (che consiste nel legame di molecole di acido miristico, che è un acido grasso, a residui di glicina posti all'N terminale) della proteina e causa un alterato ancoraggio della proteina SHOC2 alla membrana intracellulare impedendo la corretta traslocazione di SHOC2 al nucleo in seguito a stimoli secondari all'azione dei fattori di crescita.

Si ritiene che SHOC2 moduli positivamente il pathway agendo come regolatore della componente catalitica della PP1C (protein phosphatase 1C) permettendo la defosforilazione del residuo Ser259 della PP1C mediata da RAF1. Pertanto si è osservato che proteina SHOC2 mutata determina un incremento dell'attivazione di ERK con modalità cellulo-specifica, grazie alla traslocazione di membrana costitutiva di SHOC2 che prolunga la defosforilazione di PP1C mediata da RAF1 e sostiene così l'attivazione di MAPK mediata da RAF1 [Cordeddu et al., 2009].

DIAGNOSI

La diagnosi deve essere formulata secondariamente al riconoscimento degli aspetti clinici caratteristici, ponendola in diagnosi differenziale con le altre condizioni coinvolte nelle alterazioni del pathway RAS-MAPK, e potrà essere confermata mediante lo studio molecolare di SHOC2.

1.4.6 SINDROME DI LEGIUS

E' una patologia autosomica dominante caratterizzata da MCL multiple in assenza di neurofibromi o altre manifestazioni tumorali tipiche della Neurofibromatosi tipo 1, macrocefalia e freckling [Messiaen et al., 2009].

Altre caratteristiche di comune riscontro sono:

- Fenotipo facciale Noonan like
- Bassa statura (0%-35%)
- Lipomi
- Disabilità intellettive, ADHD, ritardo dello sviluppo psicomotorio

Riportati in diversi studi con prevalenza differente anomalie del torace, come il pectus excavatum (7%-26%) [Messiaen et al., 2009; Brems et al., 2007; Muram-Zborovski et al., 2007].

La clinodattilia del V dito è stata riscontrata in 2 soggetti e in alcuni individui è stata anche rilevata polidattilia post-assiale [Denayer et al., 2011].

Uno studio di Denayer et al [2011] ha mostrato in 15 soggetti Legius un QI pari a 101.57, con riduzione del QI di performance.

In letteratura al momento sono descritti 200 casi con diagnosi molecolare di sindrome di Legius, pertanto per delinearne meglio le caratteristiche fenotipiche e la storia naturale sarà necessario identificare un gruppo maggiore di pazienti. Lo studio di casi familiari o sporadici di soggetti con diagnosi clinica di NF1, ha messo in evidenza come la mutazione di SPRED1 sia presente nello 0.5%-1% dei casi negativi per la mutazione di NF1.

CENNI STORICI

I soggetti affetti da sindrome di Legius furono inizialmente descritti con il termine neurofibromatosi tipo 1-like syndrome. Nel 2007, durante il 13th Congresso Europeo della Neurofibromatosi di tipo 1, è stato deciso di denominare questa condizione, che presentava aspetti cutanei ma non tumorali della neurofibromatosi di tipo 1 per meglio distinguerla da essa, come sindrome di Legius, derivante dal nome di Eric Legius, autore senior dello studio che descriveva per la prima volta il fenotipo clinico derivante dalla mutazione di SPRED1.

EZIOPATOGENESI

SPRED1

E' l'unico gene, localizzato sul cromosoma 15q13.2, identificato come responsabile della Sindrome di Legius e codifica una proteina regolatrice negativa del pathway RAS-MAPK [Brems et al., 2007].

Il gene SPRED1 contiene 7 esoni e codifica per la proteina SPRED1, membro della famiglia di proteine SPROUTY/SPRED, regolatori negativi del pathway mediante l'inibizione dell'interazione RAS-RAF.

La proteina SPRED1 è costituita da un dominio N-terminale EVH-1 e da un dominio C-terminale SPRY coinvolto nella traslocazione alla membrana plasmatica, al legame con RAF e all'eterodimerizzazione con altre proteine SPRED. SPRED1 di base regola negativamente RAS sopprimendo la fosforilazione e l'attivazione di RAF.

Le mutazioni descritte a carico di SPRED1 sono delezioni, inserzioni, frameshift, mutazioni missenso e non senso che determinano la formazione di un codone di stop, determinando la sintesi di una proteina non funzionante o che viene degradata precocemente. Pertanto la mutazione determina un incremento dell'attività kinasica di RAF1 [Wakioka et al., 2001].

DIAGNOSI

La diagnosi di sindrome di Legius deve essere ipotizzata quando all'esame obiettivo sono presenti MCL e freckling in assenza di criteri non cutanei di Neurofibromatosi di tipo 1 (noduli di Lisch, neuro fibromi, gliomi del nervo ottico, displasia dello sfenoide, displasia delle ossa lunghe), in età post-puberale.

1.4.7 SINDROME ASSOCIATA A MUTAZIONE DI CBL

Tre recenti studi indipendenti hanno dimostrato mutazioni germinali in eterozigosi del gene CBL responsabili di una condizione non precedentemente descritta con caratteristiche cliniche sovrapponibili alla sindrome di Noonan [Martinelli et al., 2010; Perez et al., 2010; Niemeyer et al., 2010] [Martinelli et al., 2010].

Le caratteristiche cliniche identificate in pazienti CBL mutate sono:

- Ritardo dello sviluppo psicomotorio di grado variabile
- Ritardo di crescita
- Dismorfismi facciali
- MCL

Mutazioni di CBL sono associate ad aumentata frequenza di leucemia mielomonocitica giovanile.

Studi su una casistica più ampia saranno necessari per delineare eventualmente in modo più preciso lo spettro fenotipico.

CBL

CBL [Martinelli et al., 2010] appartiene alla famiglia delle E3 ubiquitin-ligasi che regolano negativamente la trasduzione del segnale a partenza da recettori tirosina-kinasi, ma che contribuisce anche come adattatore alla trasmissione a valle del segnale. CBL media la coniugazione dell'ubiquitina al recettore tirosin-kinasi, azione necessaria per ottenere l'internalizzazione del recettore e lo spegnimento della trasmissione del segnale mediato dalla degradazione e dal riciclaggio del recettore. Pertanto mutazioni di CBL possono essere coinvolte nell'alterazione della trasduzione del segnale del pathway RAS-MAPK ed interferire con molti processi cellulari e con i meccanismi di sviluppo.

1.5 APPROCCI TERAPEUTICI E FOLLOW-UP

I bambini affetti da *Rasopatia* richiedono una presa in carico ed un attento follow-up multidisciplinare periodico, per poter garantire una diagnosi precoce di interessamento d'organo, prevenire le complicanze, migliorare la prognosi ed offrire le opportunità terapeutiche adeguate.

Gli obiettivi principali della presa in carico e del trattamento sono:

- garantire un attento follow-up multi-specialistico e individualizzato, per migliorarne la gestione e la storia naturale
- se presente un ritardo di crescita associato a deficit di ormone della crescita (GH), considerare la possibilità di terapia con GH
- fornire un adeguato trattamento farmacologico o chirurgico per le complicanze d'organo
- fornire un corretto supporto psicologico

Trattamento del ritardo dell'accrescimento

La bassa statura è il carattere fenotipico più costante e caratteristico della Sindrome di Noonan e delle patologie correlate, manifestandosi già in età pediatrica come ritardo progressivo dell'accrescimento. In tale età può rappresentare l'unico segno clinico indicativo della condizione, in pazienti con stigmate malformative sfumate. Durante l'età puberale, la statura di questi soggetti si pone ulteriormente al di sotto della curva di normalità e la statura definitiva di questi pazienti è

significativamente al di sotto dei valori di normalità per la popolazione generale.

Numerosi tentativi terapeutici sono stati effettuati con l'obiettivo di accelerare la velocità di crescita di questi soggetti e di migliorarne la statura definitiva, soprattutto con la somministrazione di ormone della crescita.

Il trattamento della bassa statura influisce su molti altri aspetti inerenti la gestione dei pazienti con Rasopatia, quali l'adattamento psicologico, la socializzazione e il rendimento scolastico.

Trattamento farmacologico o chirurgico delle complicanze d'organo

Cardiopatìa

Le problematiche cardiologiche rappresentano l'aspetto di maggiore rilevanza clinica. Le anomalie più frequenti sono la stenosi della valvola polmonare, la cardiomiopatia ipertrofica e i difetti settali.

Nel caso di stenosi della polmonare, generalmente un attento follow-up ecocardiografico è sufficiente a controllare il difetto valvolare. Nei casi più gravi ed evolutivi è necessario ricorrere alla correzione chirurgica mediante valvuloplastica percutanea, fino alla valvulotomia nei casi di stenosi più severa.

La cardiomiopatia ipertrofica è generalmente trattata mediante terapia con β -bloccanti o Ca-antagonisti. Più raramente, se non c'è risposta alla terapia farmacologica, è indicata la terapia chirurgica per l'ostruzione del cono di efflusso del ventricolo sn mediante cardiomiectomia, o trapianto cardiaco; alcuni pazienti, soprattutto adulti, presentano aritmie che richiedono trattamento farmacologico specifico o anche l'utilizzo della cardioversione elettrica.

In assenza di patologia cardiaca, il follow-up va comunque effettuato ogni 5 anni, non potendo escludere la comparsa di segni di cardiopatia in qualsiasi fase della vita.

In caso di cardiopatia, il timing dei controlli è indicato dal cardiologo. Particolare attenzione sarà riservata a pazienti portatori di mutazioni a maggior rischio di sviluppare cardiomiopatia ipertrofica (RAF1, BRAF).

Infine, il monitoraggio cardiologico ogni 2 anni o più frequentemente su suggerimento dello specialista è indispensabile durante la terapia con GH.

La cardiomiopatia ipertrofica rappresenta una controindicazione assoluta alla terapia con GH.

Diatesi emorragica

I soggetti con sindrome di Noonan presentano una più alta prevalenza di diatesi emorragica rispetto alla popolazione generale e uno screening di base dovrà essere effettuato in caso di sintomatologia clinica o in previsione di procedure invasive.

Le indagini coagulative di primo livello consigliate sono PT, aPTT, aggregazione piastrinica secondo Born, release di ATP; il dosaggio dei fattori coagulazione (fattori VIII, IX, XI, XII, fattore di Von Willebrand) sarà effettuato in caso di screening alterato.

Una terapia coagulativa appropriata dovrà essere prevista in relazione al difetto coagulativo accertato. Evitare l'utilizzo di aspirina e farmaci contenenti acido acetilsalicilico.

Linfedema

Il linfedema generalmente è più evidente nel periodo neonatale, ma in taluni casi può persistere anche in età evolutiva. La terapia consigliata

è il linfodrenaggio manuale o con bendaggi elastici, che consente in molti casi la risoluzione della problematica clinica, sebbene siano stati descritti casi di linfedema più severo che riduce la mobilità e per i quali l'efficacia di tali trattamenti è ridotta.

Anomalie toraciche

Le deformità toraciche sono molto frequenti e la scoliosi è presente nel 10-15%. Sono inoltre riportate altre anomalie quali cifosi, spina bifida, anomalie delle vertebre e delle coste, ginocchio e cubito valgo. Frequente è l'iperlassità legamentosa. Un corretto programma di attività fisica o di ginnastica correttiva è generalmente sufficiente a controllare le deviazioni della colonna. Busto ortopedico correttivo e raramente intervento chirurgico di correzione della deviazione della colonna sono richiesti solamente in un numero limitato di casi. Se il soggetto è in terapia con GH, è indispensabile un attento follow-up ortopedico annuale della gabbia toracica e della colonna.

Patologie dell'orecchio

Frequente la tendenza a sviluppare otiti medie a causa della peculiare conformazione anatomica dell'orecchio medio ed interno. Se non trattate tempestivamente con terapia antibiotica specifica, tali condizioni possono facilmente esitare in ipoacusia; in alcuni casi sono necessari interventi di drenaggio timpanico. I test uditivi vanno eseguiti nell'infanzia ed ogni 2 anni nelle epoche successive o secondo patologia; protesi acustiche sono indicate quando il difetto uditivo è severo.

Anomalie oculari

Frequenti sono le anomalie oculari sia anatomiche che funzionali: ptosi, strabismo, errori di refrazione, ambliopia e nistagmo. Le anomalie visive di refrazione comportano nella maggior parte dei casi miopia, ipermetropia ed astigmatismo. La maggior parte dei difetti richiedono trattamenti non chirurgici: occhiale ed occlusione. La terapia chirurgica ha indicazione per la cataratta e in caso di ptosi severa, che può compromettere la funzione visiva (blefaroplastica). La valutazione oculistica è quindi indicata alla diagnosi ed è indispensabile in età prescolare e un follow-up oculistico va previsto quando siano presenti anomalie oculari.

Anomalie genito-urinarie

Le anomalie renali hanno una bassa prevalenza nella SN (circa 11%): anomalie di rotazione e di fusione del rene, rene multicistico, cisti renale singola, agenesia renale monolaterale, dilatazione della pelvi, doppio distretto ureterale. Importante il trattamento delle infezioni ricorrenti delle vie urinarie, in presenza di anomalie delle vie urinarie, per cui va intrapresa un'adeguata terapia antibiotica, seguita eventualmente da profilassi. Necessario follow-up ecografico nei soggetti con anomalie renali.

La gestione ottimale del criptorchidismo in questi bambini prevede l'intervento chirurgico entro il primo anno di vita.

Difficoltà alimentari

Problemi alimentari sono presenti in un ampio numero di pazienti (soprattutto Sindrome di Costello) e rappresentano un ulteriore fattore di aggravamento del ritardo di crescita; casi gravi necessitano del posizionamento del sondino naso-gastrico e buoni risultati si ottengono con la terapia educativa alimentare.

In alcuni casi si rendono necessarie indagini endoscopiche e Phmetria.
Utili farmaci antireflusso.

Nel sospetto di patologia malformativa (es malrotazione) sarà necessaria la valutazione chirurgica.

Suscettibilità neoplastica

Nella sindrome di Noonan vi è aumentata prevalenza di leucemia mielomonocitica acuta e linfoblastica acuta, ma in bassa percentuale di pazienti. Nella Sindrome di Costello sono riportati rhabdomyosarcomi, neuroblastomi, carcinomi vescicali che richiedono attento follow-up ecografico e periodici esami urine; inoltre caratteristici della condizione papillomi cutanei della regione perinasale e perianale.

Anomalie neurologiche

Importante effettuare terapia anti-convulsivante nel caso di crisi epilettiche, chirurgia cerebrale se presenti anomalie cerebrali quali idrocefalia.

Pertanto, in relazione all'eventuale presenza di anomalie ematologiche, oculari, ORL e scheletriche sarà opportuno effettuare esami laboratoristici e strumentali appropriati per monitorarne l'evoluzione nel tempo e limitarne la progressione con eventuali trattamenti specifici.

I protocolli per il follow-up sono elaborati in relazione all'epoca di sviluppo del bambino.

Supporto psicologico

La diagnosi e le sue implicazioni devono essere spiegate accuratamente sia alla famiglia che al paziente, quando raggiunge un'età appropriata.

Utile supportare ed incoraggiare nelle famiglie, in caso di bassa statura, il concetto che un'adeguata terapia possa migliorare le condizioni accrescitive dei bambini; le problematiche cardiologiche, affrontate sia da un punto di vista farmacologico che chirurgico, non compromettono generalmente la qualità di vita dei pazienti.

Necessario inoltre il supporto psicologico nei pazienti con ipogonadismo, per affiancarli nella fase di induzione puberale farmacologica.

Quando necessario, dovrà essere attivato un supporto a livello scolastico ed eventualmente l'affiancamento di un insegnante di sostegno.

Alla luce della cronicità della patologia e della necessità di una presa in carico a lungo termine, sarà necessario garantire al paziente e ai suoi familiari un adeguato sostegno psicologico nel medio-lungo periodo.

CAP.2 RASOPATIE, BASSA STATURA e TRATTAMENTO CON GH

2.1 BASSA STATURA e ANDAMENTO ACCRESCITIVO NELLE RASOPATIE

Il ritardo di crescita è una caratteristica costante delle *Rasopatie*.

Diversi studi hanno riportato i dati sulla crescita spontanea in pazienti affetti da sindrome di Noonan (SN) [Ranke et al., 1988; Witt et al., 1986; Shaw et al., 2007], ma gli standard di crescita per i pazienti con diagnosi molecolare confermata sono stati generati solo di recente [Malaquias et al., 2012].

La maggior parte dei pazienti affetti dalla *Sindrome di Noonan* presentano peso alla nascita e l'altezza entro i limiti di norma, ma successivamente si assiste ad una rapida perdita staturale pari a 1-1,5 DS nel primo anno di vita. Dopo i 2-4 anni di età, mediamente seguono il 3 ° percentile fino alla pubertà, che è generalmente ritardata di circa due anni e caratterizzata da un ridotto picco di crescita staturale. Allo stesso modo, l'età ossea tende ad essere in ritardo di circa due anni rispetto all'età cronologica, a partire dai quattro anni di vita [Ranke et al., 1988; Otten e Noordam, 2007].

La statura definitiva media riportata, secondo Ranke et al., è pari a 152.7 cm nelle femmine e 162.5 cm nei maschi. Seppur in numero limitato, altri dati di statura finale sono stati pubblicati, e il recente studio condotto da Malaquias et al. [2012], in cui tutta la coorte di

pazienti ha caratterizzazione molecolare, sono riportate una statura finale pari a 157.4 cm per i maschi e a 148.4 cm per le femmine, parametri inferiori riferibili probabilmente all'origine etnica dei pazienti.

Soggetti con *sindrome cardiofaciocutanea* (CFC, MIM 115150) alla nascita tendono a presentare parametri accrescitivi normali, ma successivamente il ritardo di crescita si verifica comunemente (78%) a causa delle severe difficoltà alimentari. Due terzi dei soggetti affetti presentano statura sotto il 3° centile [Allanson et al., 2011], e anche il peso è generalmente inferiore alla norma [Roberts et al., 2006].

L'ipercrescita prenatale con peso relativamente elevato (> 50 ° percentile nell'89% dei casi) [Hennekam, 2003] è tipica della *sindrome Costello*, probabilmente causato dalla presenza di idrope fetale [Lin et al., 2009]. La perdita di peso nei primi giorni dopo la nascita è dovuta alla risoluzione dell'edema e ai gravi problemi di suzione e deglutizione [Gripp et al., 2012], già presenti nel periodo prenatale, come evidenziato dal polidramnios. Il grave ritardo di crescita è particolarmente severo all'età di 12 mesi [Sammon et al., 2012]. Come in altre RASopatie, frequentemente l'età ossea è ritardata. Mediamente la statura adulta è pari a 138 centimetri [Van Eeghen et al., 1999].

Nella *sindrome di Noonan con lentiggini multiple* (NSML, precedentemente denominata *sindrome LEOPARD*), il peso alla nascita è normale o superiore alla media in 1/3 dei casi [Digilio et al., 2006]. Ritardo di crescita staturale al di sotto del 3 ° centile è riportato in circa il 25% dei soggetti, e l'altezza finale è nell'85% dei pazienti al di sotto del 3 ° percentile [Gorlin et al., 1971; Voron et al., 1976; Sarkozy et al., 2008].

La bassa statura è stata descritta in una percentuale significativa (<23%) dei pazienti affetti da *sindrome Legius* [Brems et al., 2012].

In soggetti con NS/LAH, la bassa statura è spesso associata a deficit dell'ormone della crescita (GHD) [Mazzanti et al., 2006; Cordeddu et al., 2009; Mazzanti et al., 2013].

I dati relativi alla crescita spontanea e alla terapia con ormone della crescita sono stati riportati in alcuni bambini [Mazzanti et al., 2006; Capalbo et al, 2012.; Malaquias et al, 2012.; Mazzanti et al., 2013]. Malaquias et al. [2012] ha descritto quattro soggetti con una crescita notevolmente ridotta e un basso indice di massa corporea. Coerentemente con questi dati, abbiamo recentemente riportato in questi pazienti bassa statura circa -3 DS di altezza rispetto alla popolazione generale italiana [Mazzanti et al., 2013].

2.1.1 Meccanismi causativi di bassa statura e risposta alla terapia con ormone della crescita in pazienti con RASopatia

La causa della bassa statura nelle RASopatie rimane da chiarire.

Sono stati segnalati diversi meccanismi, tra cui il deficit di ormone della crescita (GH) [Cotterill et al., 1996; Romano et al., 1996; Padidela et al., 2008], la disfunzione neurosecretoria [Ahmed et al., 1991, Tanaka et al., 1992; Noordam et al., 2001, Padidela et al., 2008], o la resistenza al GH [Binder et al., 2005; Ferreira et al., 2005; Limal et al., 2006; Bertelloni et al., 2013].

In particolare, Cotterill et al, valutando la risposta alla terapia con GH in 47 pazienti trattati per 4 anni, riporta una prevalenza di GHD pari al 45% Tanaka et al ha riportato normale risposta ai test di stimolo, alterazione della secrezione notturna spontanea (12 h) di GH e incremento dei valori di IGF1.

In letteratura gli studi ad oggi effettuati hanno posto particolare attenzione all'andamento accrescitivo e alla risposta alla terapia con ormone della crescita (GH) nella sindrome di Noonan, essendo disponibili casistiche più ampie di pazienti affetti da tale condizione, rispetto alle altre più rare e recenti patologie del pathway RAS-MAPK.

La secrezione e il trattamento con GH nelle RASopatie è ancora oggetto di dibattito. I dati pubblicati sono difficilmente comparabili per l'utilizzo di protocolli eterogenei con diversi criteri di selezione e composizione della coorte di pazienti (differente età di inizio della terapia, diversi anni di terapia, dosaggio terapeutico utilizzato, conferma o meno di diagnosi molecolare) e l'utilizzo di differenti standards di comparazione, per la popolazione generale o per condizione. Ad oggi non sono stati pubblicati studi randomizzati sull'efficacia terapeutica in queste condizioni.

La valutazione dell'efficacia del trattamento con GH in soggetti affetti da RASopatie ha fornito risultati contraddittori [Kirk et al., 2001; Osio et al., 2005; Otten et al., 2007; Romano et al., 2009; Lee ed altri, 2012.; Choi et al., 2012]. Ad oggi è stato riportato un guadagno staturale medio compreso tra 0.6 e 2 DS [Dahlgren et al., 2009]. Finora solo pochi studi hanno riportato dati sulla statura finale (FH) in soggetti con RASopatia trattati con GH.

Noonan et al. ha effettuato una recente revisione di efficacia e sicurezza della terapia con GH in 15 studi clinici/case reports e 4 studi osservazionali effettuati dal 1990 al 2014. La diagnosi di SN in questi pazienti era su base clinica o con conferma molecolare e sono stati valutati la risposta a breve termine della terapia con GH, la statura finale, gli effetti della terapia con GH sulla composizione corporea, l'andamento puberale, fattori predittivi sull'outcome staturale, e la sicurezza terapeutica. Le coorti degli studi presi in considerazione erano eterogenee per durata e dose trattamento, ma tutti i clinical trials presi in considerazione riportavano un positivo guadagno staturale sia dopo 1 anno di terapia [Cotteril et al., 1996, de Schepper et al., 1997] sia dopo durata maggiore [MacFarlane et al., 2001]. Tra gli studi osservazionali, Lee et al., riporta dopo 4 aa di terapia una normalizzazione staturale per età e sesso rilevando una statura superiore alle -2 DS. In merito a dati di statura finale, l'incremento staturale medio riportato è tra 0.6 e 1.7 DS, sovrapponibile a quanto riportato dalla precedente revisione di Dahlgren et al.

Nei pazienti affetti da NS/LAH (sindrome Mazzanti), il deficit secretivo di ormone della crescita (GHD) è stato chiaramente descritto [Mazzanti et al., 2006; Cordeddu et al., 2009], in associazione a livelli molto bassi di IGF1 [Mazzanti et al., 2013]. In questi pazienti, FH era -2.34 ± 0.12 SDS, dopo terapia con GH a lungo termine [Mazzanti et al., 2013]. Analogamente, il deficit secretivo di GH è stato segnalato in pazienti con sindrome CFC [Legault et al., 2001; Stein RI et al., 2004; Armatura et al., 2008]. Nella CS, alcuni pazienti sono stati trattati con GH con variabile beneficio [Legault et al., 2001; Kerr et al., 2003; Stein et al., 2004], tuttavia, in questa condizione, il rischio di cardiomiopatia ipertrofica, apnee ostruttive e tumori richiede particolare attenzione per quanto riguarda l'uso della terapia con GH [Kerr et al., 2003].

2.2 ASSE GH-IGF1

L'ormone della crescita (GH) è un polipeptide a catena unica di 191 aminoacidi e del peso molecolare di 22 kd. Il GH è prodotto dalle cellule acidofile somatotrope, che costituiscono il 45-50% delle cellule ipofisarie localizzate nella parte anterolaterale dell'adenoipofisi.

La sintesi dell'ormone avviene a partire da un suo precursore (pre-GH) dal PM di 28 kd, con un peptide extra di 30 aminoacidi presente nell'estremo amino-terminale. Normalmente circa il 75% del GH prodotto è costituito dalla forma matura di 22 kd, mentre lo splicing alternativo del secondo codone determina la delezione degli aminoacidi dal 32 al 46, che porta alla produzione di una forma dal PM di 20 kd che rappresenta circa il 10% del GH ipofisario.

La sua secrezione è regolata dall'azione combinata e contrapposta di due neurormoni ipotalamici, il GH-releasing hormone (GHRH) e la somatostatina (SS) i quali, rispettivamente, ne stimolano ed inibiscono il rilascio.

Il GHRH maturo è sintetizzato dai neuroni del nucleo arcuato ipotalamico, la sua attività è specie-specifica, in correlazione alla specificità del legame al recettore associato a proteina G presente sulle cellule somatrotrope. La regolazione della produzione di GH da parte del GHRH è mediata dalla stimolazione dell'adenilato-ciclastasi cui consegue un aumento di AMPc.

Il rilascio del GHRH e della SS da parte dell'ipotalamo costituisce la tappa finale che modula la secrezione del GH in risposta a stimoli di natura diversa, sia centrali sia periferici, ed è regolato da un complesso "sistema" di neurotrasmettitori e neuropeptidi. Oltre al GHRH ed alla SS altri neuro-ormoni e neuropeptidi partecipano alla regolazione della secrezione di GH.

La somatostatina è un tetradecapeptide sintetizzato nell'area preottica mediale e periventricolare dell'ipotalamo anteriore. La sua azione sembra essere correlata più al tempismo e all'ampiezza della secrezione pulsatile del GH, che alla regolazione della sua sintesi.

Il legame della somatostatina al suo recettore porta all'inibizione dell'adenilato ciclastasi, alla riduzione della concentrazione intracellulare di calcio e conseguentemente all'inibizione della secrezione di GH.

La secrezione pulsatile dell'ormone della crescita osservata in vivo è verosimilmente risultato di una simultanea riduzione del rilascio di somatostatina ipotalamica e dell'aumento del GHRH.

Il GH, inoltre, autoregola la propria secrezione con un meccanismo di "feedback" sia diretto che mediato dall'insulin-like growth factor I (IGF-I), e probabilmente anche da altri fattori periferici. Il risultato di questa complessa regolazione è una secrezione di tipo pulsatile nel corso delle 24 ore.

Nell'uomo si riscontrano numerosi episodi secretori (pulses) nell'arco delle 24 ore, con una amplificazione notturna legata alle fasi di sonno profondo.

Nell'uomo il pattern secretorio pulsatile del GH influenza la produzione di IGF-I e delle sue proteine di legame.

La sintesi del GH è codificata da un gruppo di geni localizzati nel braccio lungo del cromosoma 17.

Il GH è secreto in forme molecolari diverse. La principale forma molecolare del GH è la 22K (circa il 75%) seguita dalla 20K (circa il 15%) e dalle forme acidiche. Mutazioni o delezioni del gene hGH-N causano gravi forme di nanismo con assenza totale di GH, o con concentrazioni estremamente basse o con forme di GH biologicamente inattive. La secrezione spontanea di GH è soggetta a modificazioni legate all'età. Le concentrazioni di GH delle 24 ore sono, infatti, elevate nel neonato a causa di un aumento sia della frequenza sia dell'ampiezza dei picchi secretori. Tale ipersecrezione si riduce fino a valori normali nell'arco dei primi giorni di vita, e rimane tale fino alla pubertà, momento della vita in cui la secrezione di GH aumenta ancora. Sia la pubertà spontanea che la pubertà indotta farmacologicamente con GnRH, gonadotropine o steroidi sessuali si accompagna ad un aumento della secrezione spontanea di GH, aumento mediato dagli estrogeni sia nel maschio che nella femmina, e determinato da un incremento dell'ampiezza dei picchi secretori ma non della loro frequenza.

La secrezione di GH si riduce quindi con le fasi più avanzate della pubertà, rimane tale per tutta l'età adulta, e si riduce con la vecchiaia. L'ormone della crescita autoregola la propria secrezione con un meccanismo di feedback. Numerosi studi hanno messo in evidenza l'esistenza di un feedback lungo, corto ed ultracorto.

La produzione giornaliera di GH nell'uomo si aggira tra gli 0,25 e gli 0,52 mg/m², tuttavia un'ampia varietà di condizioni ne modifica la secrezione. La massima secrezione avviene durante la notte, in particolare in corrispondenza della prima parte del sonno, in cui predomina il tracciato EEG ad onde lente (stadi 3 e 4 o sonno Non-REM).

Il GH circola in forma sia libera che legata a due specifiche proteine di legame, la più piccola delle quali altro non è che la porzione extracellulare del suo recettore, dal quale origina per idrolisi. Una

molecola di GH si lega a due molecole di recettore, un peptide di 638 aminoacidi che viene poi processato in una forma più matura di 620 aminoacidi da 1 PM di 70 kd.

Esso è costituito da tre domini: un dominio extracellulare che lega l'ormone, uno transmembranario ed uno citoplasmatico. Il gene per il recettore del GH è localizzato sul cromosoma 5p13-p12 dove si estende per più di 70 kb. Il GHR mostra un'ampia omologia di sequenza con il recettore per la prolattina e condivide delle sequenze omologhe con i recettori per le interleuchine, con il recettore per l'eritropoietina, con il GMCSF e l'INF.

Dopo aver legato il suo recettore ed averne indotto la dimerizzazione, il GH stimola la fosforilazione di una proteina dal PM di 120 kd, la Janus Kinase 2 (JAK2) una tirosina chinasi associata al recettore. Questa interazione ormone-recettore porta alla fosforilazione e defosforilazione di proteine citoplasmatiche e nucleari, oltre che alla stimolazione della trascrizione di geni bersaglio.

In condizioni di equilibrio circa il 40-50% del GH circolante è legato alla proteina GHBP ad alta affinità e specificità, ma con bassa capacità, tale che solo il 45% dell'ormone è legato ad esse. Le GHBP prolungano l'emivita del GH agendo a livello della filtrazione glomerulare e modulando il legame al GHR.

I fattori di crescita insulino simile, le IGF o Insuline-like Growth Factor, costituiscono una famiglia di peptidi che si pensa medino molte delle azioni anaboliche del GH. IGF-1 è un peptide basico di 70 aminoacidi, noto in passato come somatomedina-C, mentre IGF-2 è un peptide debolmente acido di 67 aminoacidi. I due peptidi sono strutturalmente correlati ed hanno un'omologia strutturale con l'insulina di circa il 50%. Questo spiegherebbe la capacità di entrambe le IGF di legare il recettore per l'insulina.

Il GH esercita i suoi molteplici effetti su numerosi organi e tessuti. Il suo ruolo principale è quello di stimolare la crescita della cartilagine di accrescimento cui si associano effetti metabolici sul metabolismo glicidico, lipidico, protidico e minerale. A livello della cartilagine il

GH stimola direttamente la differenziazione delle cellule progenitrici localizzate nella zona prossimale dell'epifisi, le quali vanno incontro a proliferazione clonale sotto lo stimolo dell'IGF-I con il risultato della crescita dello scheletro.

Il GH stimola la produzione di IGF-I sia dal fegato che da altri tessuti. La sintesi dell'IGF-I è codificata da un gene localizzato nel braccio lungo del cromosoma 12.

La IGF-I a sua volta circola legata ad una famiglia di proteine di legame che, oltre al ruolo di trasporto nei fluidi extracellulari, sembrano modulare l'azione dell'IGF-I a livello cellulare sia in senso stimolatorio che in senso inibitorio. La principale di queste proteine è la IGF binding protein 3 (IGFBP-3) che con una subunità acido labile e la IGF-I forma un complesso macromolecolare di circa 150-kilodalton. L'IGFBP-3 lega la maggior parte dell'IGF-I circolante e, nell'uomo la sua produzione è principalmente regolata dal GH. Questa proteina di trasporto sembra inibire l'azione delle IGF competendo con il legame a livello recettoriale.

A livello metabolico il GH e l'IGF-I stimolano la lipolisi, aumentano i NEFA circolanti e le concentrazioni di fosforo, aumentano l'escrezione urinaria di calcio, ed antagonizzano gli effetti dell'insulina.

Dal momento che la secrezione di GH è di tipo episodico, la misurazione del GH su un singolo campione non è utile dal punto di vista diagnostico. Per questa ragione vengono valutate le concentrazioni del GH dopo appropriati test da stimolo, fisiologici o farmacologici.

La definizione di normale secrezione di GH pone ancora oggi notevoli problemi.

La risposta ai test da stimolo farmacologici viene utilizzata da decenni nella diagnosi del deficit di GH, sebbene non vi sia generale accordo sui limiti di normalità (es. picco di risposta del GH di 7 o 10 $\mu\text{g/L}$; attualmente, dal 2014, in Italia viene considerato patologico un picco $\leq 8 \mu\text{g/L}$).

Allo stato delle conoscenze attuali, tuttavia, la diagnosi del deficit di GH si basa sul rilievo dei dati clinico-auxologici, sulla risposta del GH ai test da stimolo e sullo studio neuroradiologico dell'ipofisi e della regione diencefalica.

Stimolatori fisiologici della secrezione sono l'iperglicemia postprandiale; l'esercizio fisico; lo stress; stimoli farmacologici; l'ipoglicemia; alcuni ormoni tra cui la somatostatina; GHRH IGF-I; TRH; CRH; ACTH; la vasopressina; il progesterone; gli estrogeni; i glucocorticoidi; il glucagone; alcuni neurotrasmettitori come l'istamina, la norepinefrina, la dopamina, l'acetilcolina, il VIP, la gastrina, la neurotensina, la sostanza-P, e neuropeptidi; numerosi aminoacidi: arginina, ornitina e la metionina.

Il deficit di GH da iposecrezione può essere isolato o associato a deficit di altri ormoni ipofisari. Il deficit isolato può essere idiopatico, può essere il risultato di una anomalia del gene del GH o del gene che codifica per il recettore del GHRH, o essere determinato da cause organiche (difetti congeniti, tumori, infezioni, irradiazione cranica). Nel caso di processi espansivi endocranici il deficit di GH è spesso il primo deficit ormonale, al quale poi seguono quelli delle altre tropine ipofisarie. Nei bambini il tumore che più frequentemente causa un deficit di GH è il craniofaringioma.

Il deficit di GH isolato può essere associato a ritardo mentale o ad agammaglobulinemia in due rare forme ereditarie legate al cromosoma X. Il deficit di GH associato a deficit di altre tropine ipofisarie può essere idiopatico in circa il 30% dei casi, o si riscontra nell'ambito di alcune anomalie molecolari che interessano geni che codificano per fattori di trascrizione indispensabili per lo sviluppo e la differenziazione cellulare dell'ipofisi (Pit-1, Prop-1, LHX3), ed in alcune rare forme di panipopituitarismo familiare (autosomico recessivo e legato al cromosoma X). Oltre al deficit da iposecrezione è nota la sindrome da resistenza all'azione dell'ormone: la Sindrome di Laron. In questo caso il disturbo trova la sua causa in un difetto molecolare del gene che codifica per il recettore del GH. Questi

pazienti sono caratterizzati da una grave forma di nanismo associata ad elevate concentrazioni di GH e a concentrazioni di IGF-I indosabili o estremamente ridotte.

2.2.1 Mutazione di PTPN11: influenza sull'andamento accrescitivo e sul trattamento

In considerazione dei risultati degli studi di genetica molecolare è stata avanzata l'ipotesi di una parziale resistenza al GH da difetto di segnale post-recettoriale in soggetti con mutazione in PTPN11 [Binder et al., 2005; Limal et al., 2006].

Circa il 50% dei soggetti Noonan presenta una mutazione missense tipo gain of function del gene PTPN11, che codifica per la proteina ubiquitaria, SHP-2. E' stato dimostrato che SHP2 è direttamente associata al recettore per il GH (GHR). Un aumento dell'azione della proteina SHP-2 sembra avere un effetto negativo sull'azione fisiologica di GH ed IGF1, profilandosi una condizione di insensibilità parziale al GH, in grado di influenzare l'andamento accrescitivo di questi bambini e la loro risposta al trattamento con GH. Un recente studio [De Rocca Serra-Nedelec et al., 2012] ha dimostrato come nella sindrome di Noonan da mutazione SHP2 vi sia l'inibizione della sintesi di IGF1 indotta dal GH, attraverso l'iperattivazione di RAS/ERK1/2.

Sono ancora poche e su piccoli numeri le casistiche che riportano le correlazioni genotipo-fenotipo in merito alla risposta al GH. Studi accrescitivi accompagnati dalle indagini molecolari riportano risultati preliminari. Ferreira et al. [2005] e Binder et al. [2005] riportano che la presenza di mutazioni di PTPN11 sembra determinare una ridotta risposta a breve termine alla terapia con GH, rispettivamente dopo 3 e 5 anni di trattamento ed i pazienti senza mutazione mostravano livelli

ematici di IGF1 ed IGFBP3 più elevati rispetto ai pazienti con mutazione. Questi studi sembrano confermare una lieve resistenza all'azione del GH, mediata da un difetto di segnale post-recettoriale, in presenza di mutazione di PTPN11. Uno studio prospettico a lungo termine condotto dal gruppo di Noordam et al. [Noordam et al., 2008] in 27 soggetti valutati per i geni Noonan-correlati e trattati con GH alla dose di 0.35 mg/Kg/sett non sembra confermare gli effetti della mutazione PTPN11 sulla statura definitiva. Il guadagno staturale medio è di 1.3 DS sulle curve standard specifiche e migliore velocità di crescita viene osservata nei soggetti senza mutazione PTPN11 nel breve termine, ma non nel lungo-termine. D'altra parte un chiaro limite allo studio è rappresentato dalla preponderanza di soggetti PTPN11 positivi (22/27). Uno studio del 2012 condotto da Lee et al. ha valutato l'incremento staturale di 120 soggetti affetti da sindrome di Noonan sottoposti a 4 anni di terapia con GH, mostrando un incremento staturale dalle -2.65 DS ad inizio terapia a -1.32 DS a 4 anni di terapia con GH, senza differenze significative tra maschi e femmine.

2.3 ASPETTI GENERALI DELLA TERAPIA CON ORMONE DELLA CRESCITA

L'utilizzo della terapia con Ormone della Crescita ricombinante (GH) in Italia, durante l'età evolutiva, è stato approvato in diverse condizioni cliniche:

- Sindrome di Turner citogeneticamente dimostrata
- Deficit staturale nell'insufficienza renale cronica
- Sindrome di Prader Willi in soggetti prepuberi
- Soggetti con mutazione del gene SHOX, geneticamente dimostrata
- Piccoli nati SGA

I bambini con la Sindrome di Noonan e patologie correlate, come già riportato da molteplici studi, sebbene possano presentare anomalie nell'asse GH/IGF1, non sono generalmente caratterizzati da un'insufficienza della produzione endogena di GH; quindi per poter intraprendere il trattamento con il GH ricombinante questi pazienti devono soddisfare restrittivi criteri clinico-laboratoristici.

In vigore fino al 2014

1) Criteri clinico-auxologici:

- a) Statura $\leq -3DS$ oppure statura $\leq -2 DS$ e velocità di crescita/anno $< -1 DS$ rispetto alla norma per età e sesso, misurata a distanza di almeno 6 mesi con le stesse modalità;
- b) Velocità di crescita/anno $< - 2 DS$ o $< - 1,5 DS$ dopo due anni consecutivi anche in assenza di bassa statura; nei primi due anni di vita, sarà sufficiente fare riferimento alla progressiva decelerazione della velocità di crescita (la letteratura non fornisce a riguardo dati definitivi in termini di DS);
- c) Malformazioni/lesioni ipotalamo-ipofisario dimostrate a livello neurologico o difetti ipofisari multipli che comportino deficit di GH accertato in base ad una delle modalità del punto b.

2) Criteri laboratoristici

- a) risposta di GH $< 10\mu\text{g/l}$ ad almeno due test farmacologici eseguiti in giorni differenti;
- b) risposta di GH $< 20\mu\text{g/l}$ nel caso uno dei due test impiegati sia GHRH + arginina o GHRH + piridostigmina
- c) secrezione spontanea media di GH nelle 24 ore, o quanto meno nelle 12 ore notturne, $< 3\mu\text{g/l}$ in presenza di normale risposta ai test farmacologici e valori di IGF1 $< - 2 DS$

Dal 2014 è entrata in vigore la nuova nota AIFA 39, che prevede i seguenti criteri:

1) Criteri clinico-auxologici:

a) statura ≤ -3 DS

oppure

b) statura ≤ 2 DS e velocità di crescita/anno $< -1,0$ DS per età e sesso valutata a distanza di almeno 6 mesi o una riduzione della statura di $0,5$ DS/anno nei bambini di età superiore a due anni.

oppure

c) Statura inferiore a $-1,5$ DS rispetto al target genetico e velocità di crescita/anno ≤ -2 DS o $\leq -1,5$ DS dopo 2 anni consecutivi.

d) velocità di crescita/anno ≤ -2 DS o $\leq -1,5$ DS dopo 2 anni consecutivi, anche in assenza di bassa statura e dopo aver escluso altre forme morbose come causa del deficit di crescita;

oppure

e) malformazioni/lesioni ipotalamo-ipofisario dimostrate a livello neuro-radiologico;

associate a

2) Criteri laboratoristici

a) risposta di GH < 8 $\mu\text{g/L}$ a due test farmacologici eseguiti in giorni differenti

b) risposta di GH < 20 $\mu\text{g/L}$ nel caso il test impiegato sia GHRH + arginina

2.3.1 Efficacia e Sicurezza

Il trattamento sostitutivo con Ormone della Crescita biosintetico va quindi riservato solo ai casi in cui vi sia un severo deficit di GH, dimostrato dai criteri clinici e laboratoristici sopra esposti.

Il rigoroso rispetto di tali criteri esclude la possibilità di un uso improprio o eccessivo del farmaco.

Quando il trattamento con GH ricombinante viene utilizzato rispettando i criteri e i dosaggi farmacologici, generalmente è abbastanza sicuro; esistono tuttavia effetti collaterali che possono manifestarsi in maniera più o meno evidente e grave, anche in rapporto alle condizioni cliniche dei pazienti.

Fra gli effetti collaterali più comunemente evidenziati vi sono quelli di natura metabolica. I pazienti che sono sottoposti a trattamento con Ormone della Crescita spesso mostrano una spiccata intolleranza al glucosio e in taluni casi iperinsulinismo. Questi dati laboratoristici talvolta, possono tradursi, da un punto di vista clinico, in un quadro di Diabete Mellito di tipo 2. Nonostante questo, comunque, una ridotta tolleranza nei confronti del glucosio o un franco Diabete Mellito di tipo 2 non rappresentano una controindicazione al trattamento con GH, sebbene si renda necessario un attento monitoraggio a lungo termine.

Altri eventi avversi di natura metabolica, talvolta descritti nei bambini che utilizzano l'Ormone della Crescita biosintetico sono l'iperlipidemia e l'ipertensione: anche questi aspetti richiedono un follow up biochimico e clinico attento e continuo.

Sono stati inoltre descritti alcuni casi, sebbene non frequenti, di ipertensione endocranica benigna – ovvero ipertensione endocranica di natura non neoplastica. Per questa ragione non vanno sottovalutati i sintomi che possono derivare da tale condizione ed in particolar modo cefalee e deficit visivi. Si impone quindi in queste condizioni cliniche un attento Esame Obiettivo Neurologico, supportato eventualmente da indagini strumentali, quali il *Fundus Oculi*.

Diversi studi presenti in letteratura ipotizzano che la terapia con GH potrebbe incrementare il rischio di insorgenza di alcune neoplasie. L'ipotesi sarebbe supportata, da un punto di vista biochimico, dal fatto che l'asse GH/IGF1 presenta un'attività mitogena che potrebbe essere associata, nei bambini che usufruiscono del trattamento, da una spontanea aberrazione o fragilità cromosomica.

In particolare sono stati riportati casi di leucemia in bambini con severo deficit di GH, trattati poi con l'Ormone biosintetico, anche se i dati ottenuti sono insufficienti per comprendere se il processo neoplastico sia effetto del deficit di GH o del conseguente trattamento. Inoltre alcuni studi riportano un incremento di tumori prostatici e coloretali in pazienti adulti che avevano beneficiato in età pediatrica del trattamento con Ormone della Crescita.

Gli studi che mettono in relazione il trattamento con GH e l'incremento del rischio neoplastico sono tuttavia caratterizzati da un'estrema povertà di dati; inoltre non è ancora disponibile un follow up a lungo termine. Per queste ragioni le ipotesi circa un ruolo causale del trattamento con GH nell'incremento dell'incidenza di tumori, non possono essere ancora confermati da un punto di vista clinico e sperimentale.

CAP. 3 IL NOSTRO STUDIO

3.1 SCOPO DELLA TESI

Le “RASopatie” includono un gruppo di patologie congenito-malformative a trasmissione autosomica-dominante causate da mutazioni eterozigoti germinali in geni che codificano per proteine coinvolte nel pathway RAS-MAPKinasi [Tartaglia et al., 2010].

Sono patologie ad interessamento multisistemico caratterizzate principalmente da dismorfismi faciali, iposomia, cardiopatia congenita e cardiomiopatia ipertrofica, anomalie ectodermiche e scheletriche, coinvolgimento cognitivo e suscettibilità tumorale, con prevalenza variabile in ogni specifica condizione [Tartaglia et al. 2011, Rauen, 2013]. Alcune RASopatie sono clinicamente e geneticamente omogenee, come ad esempio la sindrome di Costello (CS, MIM218040) e la sindrome Noonan like con loose anagen hair (NS / LAH, MIM 607721) nota anche come sindrome Mazzanti, causate da uno stretto spettro di mutazioni in HRAS [Aoki et al., 2013] e SHOC2 [Cordeddu et al., 2009], rispettivamente. Altre presentano un fenotipo particolarmente variabile, che riflette una base genetica più complessa, come documentato nella sindrome di Noonan (NS, MIM 163950), la più comune tra le RASopatie, che è causata da mutazioni in diversi geni (PTPN11, RIT1, SOS1, KRAS, NRAS, RAF1, BRAF, MEK1) [Tartaglia et al, 2011.; Rauen, 2013]. Recentemente, nel corso del 2015, è stato identificato anche il gene SOS2 come possibile ulteriore gene causativo candidato

per la SN, per il quale la nostra coorte non è stata ancora screenata. [Cordeddu et al., 2015].

La bassa statura è uno dei principali elementi distintivi dei bambini affetti da Rasopatia ed è anche la caratteristica clinica sulla quale si può agire sotto il profilo terapeutico, mediante la somministrazione di Ormone della Crescita biosintetico (GH).

In questo studio è stato pertanto analizzato un ampio gruppo di 88 pazienti affetti da Rasopatia con conferma di diagnosi molecolare, seguiti per un lungo follow-up c/o l'Ambulatorio di Malattie Rare, Sindromologia e Auxologia-Pediatria Pession, dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria S.Orsola-Malpighi.

In particolare, sono stati valutati la distribuzione per genotipo, la prevalenza delle caratteristiche fenotipiche e la correlazione genotipo-fenotipo sull'intero gruppo di studio ed in particolare, l'andamento accrescitivo, le proporzioni corporee, lo sviluppo puberale, e i dati di statura finale raggiunti in 33 soggetti, di cui 16 trattati con GH biosintetico per deficit secretivo.

Sono stati inoltre valutati l'efficacia e la sicurezza della terapia con GH, definito il rischio oncologico e quantificato il coinvolgimento psico-cognitivo.

3.2 PAZIENTI E METODI

Pazienti

La coorte di pazienti dello studio include 190 pazienti segni fenotipici riferibili a Rasopatia, reclutati c/o l'Ambulatorio di Malattie Rare, Sindromologia e Auxologia-Pediatria Pession, dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria S.Orsola-Malpighi, dal 2001 al 2014, seguiti fino al raggiungimento dell'età adulta.

La diagnosi di Rasopatia è stata effettuata mediante criteri diagnostici clinici estremamente restrittivi, quali i segni fenotipici, i parametri auxo-antropometrici, le tipiche alterazioni biochimico-laboratoristiche e strumentali, confermati dalle indagini molecolari dei geni coinvolti nel pathway RAS-MAPK. Per 88/190 pazienti affetti da *RASopatia* è stato pertanto possibile ottenere la conferma molecolare della diagnosi clinica.

I soggetti coinvolti sono stati sottoposti a studio (Sanger sequencing) dei geni del pathway RAS-MAPK, analizzando le intere sequenze codificanti (PTPN11, SOS1, KRAS, NRAS, HRAS, RIT1, SHOC2, SPRED1, BRAF, RAF1, MAP2K1 e MAP2K2). Quando possibile, lo studio molecolare è stato indirizzato secondo specifici criteri clinici nel sospetto di una delle singole condizioni nell'ambito dello spettro delle Rasopatie: sindrome di Noonan, sindrome CFC, sindrome di Costello, sindrome di Noonan con lentiggini multiple (NSML, precedentemente denominata sindrome LEOPARD), sindrome Mazzanti (NS/LAH) e sindrome di Legius.

Valutazione clinica

La valutazione clinica dei pazienti è stata effettuata nell'Ambulatorio di Malattie Rare, Sindromologia e Auxologia-Pediatria Pession, dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria S.Orsola-Malpighi, del quale è responsabile la Prof.ssa Laura Mazzanti. Per ogni paziente è stata redatta una dettagliata scheda clinica nella quale sono stati raccolti i dati anamnestici, la valutazione auxo-antropometrica e la valutazione dismorfologica. I pazienti sono stati valutati con cadenza semestrale e i controlli clinici sono stati eseguiti sempre al mattino.

Valutazione strumentale e laboratoristica

Le misurazioni antropometriche ottenute sono state comparate con gli standards delle curve di crescita per la popolazione italiana generale [Cacciari et al., 2006] e per la sindrome di Noonan [Ranke et al., 1988], espresse in deviazioni standards (SDS). La velocità di crescita espressa in SDS è stata calcolata sulle carte di Tanner [Tanner et al., 1966].

In specifico, la *statura* è stata misurata in posizione ortostatica (media di 3 misurazioni con lo stadiometro di Harpenden) in bambini con età superiore ai 3 anni, o in posizione supina in soggetti con età inferiore ai 3 anni.

Per la valutazione dell'accrescimento sono stati utilizzati:

1) *Indicatori di accrescimento somatico:*

- misure di lunghezza (statura, lunghezza arto superiore, lunghezza arto inferiore, statura seduta);
- misure di larghezza (diametro biacromiale e bicrostoiliaco, diametro anteroposteriore e trasverso del torace).

Tali misure sono state rilevate con strumentazione a lettura digitale fornita dalla “ Harpenden and Holtain” Anthropometric Instruments London. Gli strumenti utilizzati sono lo statimetro, il tavolo per la statura seduta, l'antropometro a branche curve oppure diritte e lo sliding caliper.

2) *Gli indicatori della composizione corporea utilizzati* sono stati:

- Misure di adiposità (peso, plica sottoscapolare e tricipitale);
- *BMI* (Body Mass index).

Il peso è stato misurato con una bilancia a contrappeso ed espresso in kg, ed è stato calcolato, infine, il BMI espresso in kg/m^2 .

Questi dati sono stati determinati con il metro a nastro flessibile in metallo e lo skinfold caliper, sempre forniti dalla “Harpender and Holtain”.

3) Gli *indicatori di maturazione biologica* presi infine in considerazione sono:

- Età ossea valutata secondo gli standards di Greulich e Pyle, utilizzando il metodo RUS (radio, ulna, metacarpo e falangi); valutata all'inizio del trattamento con GH e ogni 12 mesi durante la terapia
- Stadio di maturazione puberale (PH) secondo Tanner;
- Volume testicolare con orchidometro di Prader.

Tutte le misurazioni sono state eseguite da un unico misuratore esperto e le tecniche di valutazione antropometrica sono quelle basate sulle descrizioni di Tanner (1964), Cameron (1978) e Twiesselman (1969).

Per la valutazione dei valori plicometrici, prima della loro utilizzazione, è stata effettuata la trasformazione logaritmica essendo la loro distribuzione di tipo non gaussiano.

Per ogni soggetto è stata anche calcolata l'*altezza raggiungibile* (Target Height) secondo la formula seguente:

$$[(\text{altezza madre} + \text{altezza padre}) \pm 13] / 2$$

Tale parametro è espressione del bersaglio genetico dell'individuo.

La *velocità di crescita* (GV) è stata esaminata con tre diversi metodi:

1. GV (cm / anno) è stata ottenuta ad ogni timepoint come il rapporto tra la differenza in H e di età rispetto al timepoint precedente.
2. Per ogni individuo GV SDS a specifici timepoints sono stati ottenuti effettuando un confronto con i diagrammi di Tanner dopo un periodo di osservazione di almeno 6 mesi.
3. La GV e il picco di velocità di crescita (PHV) (cm / anno) sono stati stimati utilizzando il modello Preece \pm Baines 1 [Preece-

Baines, 1978; Sayers et al., 2013].

Si tratta di uno dei quattro modelli che simulano la traiettoria di crescita tenendo in considerazione l'intero periodo accrescitivo, che va dai 2 anni prima della pubertà alla statura finale (FH).

La FH è stata determinata dal rilievo di GV inferiore a 1 cm / anno, segni clinici avanzati di sviluppo puberale (stadio di Tanner pari a 4) e chiusura delle epifisi alla radiografia mano.

Per esaminare i singoli modelli di crescita, le traiettorie di GV stimate sono state centrate all'età media del picco di velocità di crescita (PHV).

I pazienti sono stati inoltre screenati per escludere altre patologie associate a deficit accrescitivo, valutando la funzionalità tiroidea e altri marcatori di malassorbimento, come la malattia celiaca.

In soggetti affetti da Rasopatia è importante effettuare un'attenta valutazione di alcuni parametri laboratoristici, come l'assetto coagulativo, al fine di individuare eventuali alterazioni dell'emostasi, ed indagini strumentali, per valutare il possibile coinvolgimento di organi ed apparati.

Pertanto le principali indagini strumentali a cui sono stati sottoposti i pazienti sono:

- ECG, valutazione cardiologica ed ecocardiogramma
- Indagini ecografiche dell'addome e dell'apparato uro-genitale (reni ed eventualmente testicoli e pelvi)
- X-grafia carpo per la valutazione dell'età ossea, a cadenza semestrale nei pazienti sottoposti a terapia con GH
- Valutazione otorinolaringoiatrica ed esame audiometrico
- Valutazione oculistica ed ortottica
- Valutazione dermatologica
- Ecografia encefalo o RMN encefalo, a seconda della fascia di età di appartenenza, in pazienti con segni o sintomi neurologici

I pazienti con statura (H) inferiore a -3 DS, o $H < -2$ SDS e $GV < -1$ SDS, o con riduzione significativa della GV (inferiore a -2 SDS / anno) sono stati testati per valutare la secrezione

di GH, con test farmacologici di stimolazione (clonidina, L-Dopa o test di arginina), come indicato dall'Agenzia Italiana del Farmaco (Agenzia Italiana del Farmaco, AIFA), nota numero 39. I campioni di siero per la determinazione della secrezione del GH sono stati raccolti a 0, 30, 60, 90 e 120 min.

Il deficit di secrezione di GH (GHD) è stato definito dal rilievo di un valore di picco di GH inferiore a 10 ng / ml in due test farmacologici. Il GH è stato somministrato per via sottocutanea alla dose di 0.035 mg/kg/die, dose modificata semestralmente in funzione dei parametri accrescitivi e di laboratorio. Durante la terapia con GH, sono stati monitorati semestralmente IGF1, glucosio, insulina, funzionalità renale ed epatica.

In epoca peri-puberale, è stato inoltre valutato l'asse ipotalamo-ipofisi gonadi (FSH, LH, dosaggio estradiolo/testosterone); il GnRH test (gonadotropin releasing hormone) è stato eseguito nei pazienti che hanno mostrato ritardo della pubertà. L'ecografia pelvica è stata effettuata nelle bambine. In tutti i pazienti la funzione cardiaca è stata monitorata periodicamente con ECG e ecocardiogramma.

Valutazione genetica

Lo studio molecolare dei geni PTPN11, RIT1, RAF1, BRAF, SHOC2, SOS1, KRAS, HRAS, NRAS e SPRED1 è stato eseguito su DNA prelevato da cellule di sangue periferico del paziente ed effettuato dal Dott. Cesare Rossi c/o il Laboratorio di Genetica Medica-Direttore Prof. Marco Seri, del Policlinico S. Orsola-Malpighi dell'Università di Bologna.

Nella fase di analisi della nostra coorte, non ancora disponibile lo studio molecolare del gene SOS2, recentemente riportato in associazione a sindrome di Noonan.

Al momento del prelievo è stato ottenuto da ogni singolo paziente, o dai suoi genitori in caso di minore, un consenso informato per l'analisi

del DNA sui geni prescelti; in alcuni casi è stato richiesto anche il prelievo dei familiari e il relativo consenso informato.

L'indagine statistica

I confronti tra sottogruppi selezionati di pazienti sono stati realizzati con test non parametrici, a causa delle dimensioni limitate del campione. Quando sono state raffrontate le medie delle variabili continue tra indipendenti, è stato utilizzato il test di Mann Whitney, mentre per variabili dicotomiche è stato utilizzato il test di Fisher. Il Wilcoxon signed-rank test è stato utilizzato per i confronti tra gli individui misurati a differenti intervalli di tempo per la stessa variabile. Tutte le analisi sono state condotte con Stata 13.1; specificatamente, la procedura pbreg [Sayers, 2013] è stata utilizzata per il modello di stima Preece±Baines.

Le analisi sono state condotte dal Dott. Dino Gibertoni e dalla Prof.ssa Maria Pia Fantini, del Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie dell'Università di Bologna.

3.3 RISULTATI

Il nostro studio ha incluso 88 pazienti, 47 (53.4%) maschi e 41 femmine (46.6%). L'età media alla prima valutazione era pari a 7.47 ± 6.92 anni. Sotto il profilo clinico, 69 pazienti (78.4%) sono risultati affetti da NS, 7 da NS/LAH (8.0%), 6 da sindrome CFC (6.8%), 2 da sindrome Costello, 2 da Sindrome NSML e 2 da sindrome Legius. 52 soggetti (59.1%) della coorte presentava mutazioni di PTPN11, mentre gli altri genotipi sono risultati complessivamente inferiori al 10% (*Tabella 3.1*) (*Figura 3.1*).

	COORTE		GH trattati	
	N	%	n.	%
Sindrome di Noonan	69	78.4	25	75.8
<i>PTPN11</i>	50	56.8	23	69.7
<i>RAF1</i>	7	8.0	1	3.0
<i>SOS1</i>	7	8.0	0	0.0
<i>KRAS</i>	2	2.3	1	3.0
<i>NRAS</i>	2	2.3	0	0.0
<i>RIT1</i>	1	1.1	0	0.0
Sindrome NSML	2	2.3	0	0.0
<i>PTPN11</i>	2	2.3	0	0.0
Sindrome cardiofaciocutanea	6	6.8	1	3.0
<i>BRAF</i>	4	4.5	1	3.0
<i>KRAS</i>	1	1.1	0	0.0
<i>MEK1</i>	1	1.1	0	0.0
Sindrome Costello	2	2.3	0	0.0
<i>HRAS</i>	2	2.3	0	0.0
Sindrome Mazzanti	7	8.0	7	21.2
<i>SHOC2</i>	7	8.0	7	21.2
Sindrome Legius	2	2.3	0	0.0
<i>SPRED1</i>	2	2.3	0	0.0
Totale	88	100.0	33	100.0

Tabella 3.1 Frequenza dei genotipi nell'intera coorte di pazienti e nel sottogruppo trattato con GH

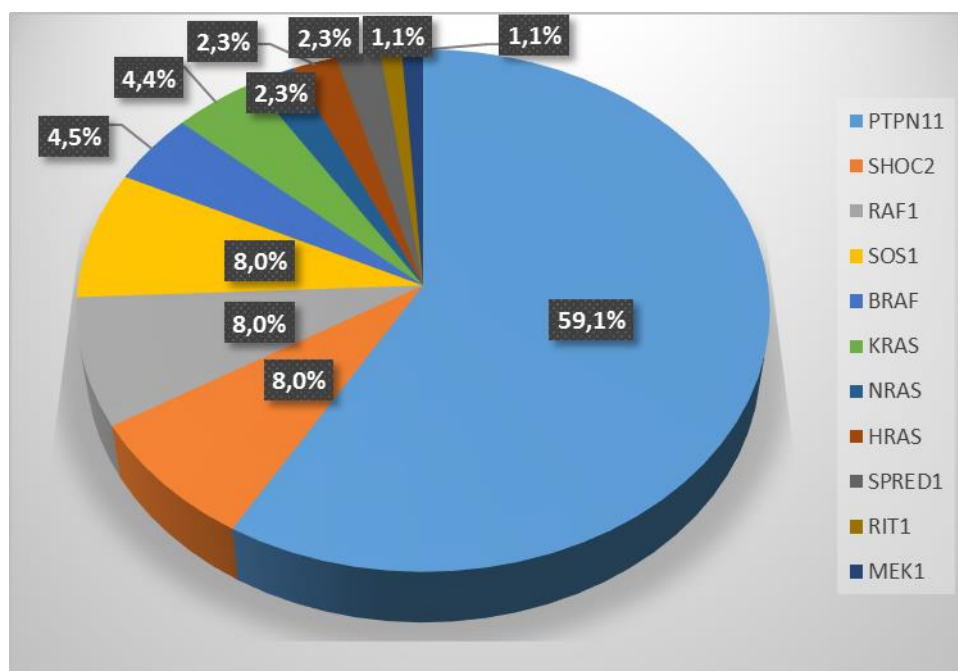


Figura 3.1 Distribuzione per genotipo degli 88 pazienti inclusi nello studio

Periodo perinatale

In relazione al periodo perinatale, la maggior parte dei pazienti è nata a termine da gravidanza decorsa fisiologicamente con adeguato adattamento perinatale. Infatti, i soggetti nati a termine, tra 38 e 42 settimane di età gestazionale (EG), sono risultati il 75% (EG 38.6 ± 1.8). Il 16.7% delle gravidanze è stato complicato da polidramnios. Il peso medio alla nascita è risultato pari a 3241.1 ± 541.5 g, la lunghezza media pari a 49.1 ± 2.4 cm. Solo 3 pazienti sono risultati con basso peso per EG e 13 hanno presentato macrosomia fetale, confermando quanto già riportato in letteratura: i pazienti affetti da Rasopatia alla nascita non hanno un significativo coinvolgimento della crescita. Il ritardo accrescitivo si manifesta precocemente in epoca post-natale.

Cardiopatie

Nella nostra coorte di pazienti è stata confermata l'elevata frequenza di cardiopatie (63 soggetti, pari al 75.9%): il 35.8% presentava stenosi della valvola polmonare, il 29.6% difetto interatriale e il 3.5% difetto interventricolare, il 17.3% displasia della valvola polmonare, il 17.3% displasia della valvola mitralica e l'1.2% valvola aortica bicuspidale.

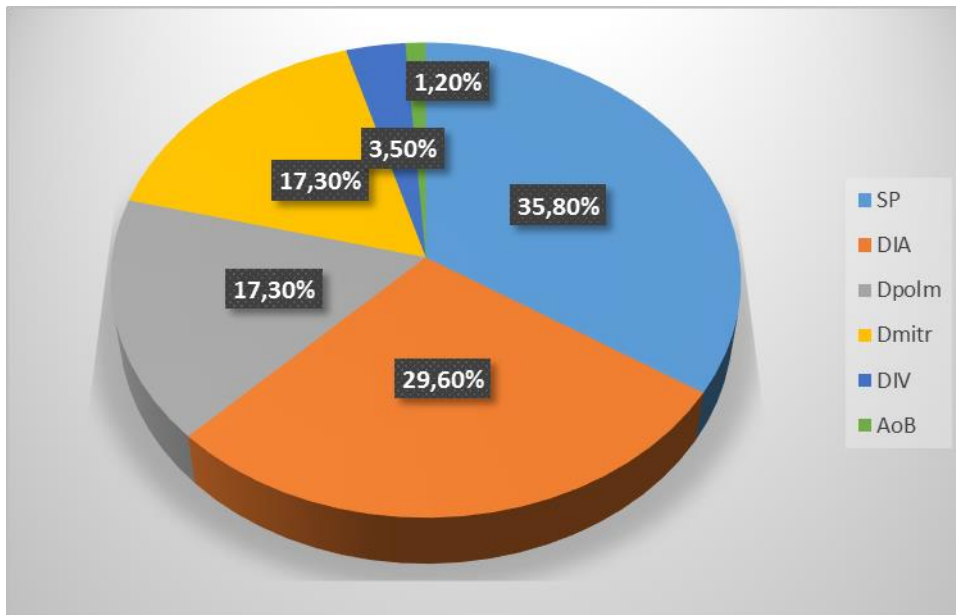


Figura 3.2 Prevalenza di cardiopatia nell'intero gruppo di studio

16 casi (20.2%) di cui fosse noto, sono stati inoltre sottoposti ad intervento cardiocirurgico correttivo.

Altre anomalie d'organo o d'apparato

Gli altri distretti coinvolti da anomalie d'organo sono risultati soprattutto l'apparato scheletrico (96.1% anomalie del torace e 44.7% scoliosi), l'occhio (48.7%), il tratto gastrointestinale (RGE) (30.8%), l'assetto coagulativo (31.4%) ed infine il rene (15.2%). Nel sottogruppo dei maschi vi è inoltre criptorchidismo nel 42.9 % dei casi. I soggetti PTPN11 mutati hanno mostrato rischio relativo di diatesi emorragica superiore di 2.08 volte ($\chi^2=13.8$, $p=0.0002$, RR 2.09 CI95% 1.5– 2.9) rispetto agli altri genotipi. Nessun paziente presentava malattia celiaca. 7 soggetti sono stati trattati per ipotiroidismo con L-tiroxina e 2 presentavano ipotiroidismo autoimmune.

Fenotipo

Per quanto riguarda i segni dismorfici facciali, gli elementi fenotipici caratterizzanti le Rasopatie sono risultati essere soprattutto gli occhi

(ptosi palpebrale nell'87.5%, epicanto nel 79.2%, rima oculare verso il basso nel 57.9%), le orecchie (basso-impianto nel 80.8%) e la regione del collo (collo corto nel 64.9% e largo nel 70.1%); valutando i differenti genotipi, è emerso un rischio maggiore di macrocefalia ($\chi^2=20.4$, $p=0.00001$, RR 3.6 CI95% 1.9 – 6.9), prognatismo ($\chi^2=6.7$, $p=0.009$, RR 2.0 CI95% 1.3 – 3.1), fronte bombata ($\chi^2=4.3$, $p=0.04$, RR 1.7 CI95% 2.1 – 2.8) e filtro prominente ($\chi^2=5.5$, $p=0.02$, RR 1.9 CI95% 1.2 – 3) nei pazienti con mutazioni in geni differenti da PTPN11 (Tabella 3.2).

DISMORFISMO	%
Macrocefalia	47.4
Scafocefalia	28.6
Brachicefalia	36.4
Asimmetria facciale	66.2
Fronte alta	35.9
Bozze prominenti	29.9
Ipertelorismo	37.7
Sopracciglia sparse	34.6
Rime palpebrali verso il basso	59.7
Epicanto	79.2
Ptosi palpebrale	85.5
Radice del naso piatta	70.1
Radice del naso larga	53.2
Filtro prominente	20.8
Bocca grande, carnosa	48.2
Orecchie bassoimpiantate	80.8
Elice spesso	31.2
Lobo grande, spesso	32.5
Micrognatia	64.1
Prognatismo	19.2
Malocclusione	50
Collo corto	64.9
Collo largo-pterigio	70.1
Cubito valgo	54.5
Cubito iperestensibile	16.9

Tabella 3.2 Segni fenotipici

Sviluppo psicomotorio e anomalie del SNC

Analizzando gli aspetti cognitivi e comportamentali dei nostri pazienti sono emersi:

- Ritardo mentale 41.1%
- Deficit visuo-spaziali 41.8%
- ADHD 38.8%

Nel 24.4% dei soggetti abbiamo inoltre rilevato anomalie del SNC (ventricolomegalia, idrocefalo, anomalia di Arnold-Chiari, cisti subependimale, craniostenosi) e anomalie del tracciato elettroencefalografico nel 6.7%.

In particolare, soggetti con mutazione in geni differenti da PTPN11 hanno mostrato un rischio maggiore di anomalie a carico del SNC ($\chi^2=4.9$, $p=0.03$, RR 1.8 CI95% 1.1 – 2.9), e al limite della significatività del tracciato EEG ($\chi^2=3.05$, $p=0.08$, RR 3.6 CI95% 1.2 – 3.4).

Suscettibilità neoplastica

Nella nostra coorte di pazienti, solo 1/88 soggetti con diagnosi molecolare confermata, ha sviluppato neoplasia.

La paziente, affetta da SN da mutazione Thr468Met di PTPN11, ha sviluppato dall'età di 11 anni, multipli tumori a cellule granulose, localizzati a livello mentoniero, degli arti e delle mani. Tali lesioni sono state sottoposte a monitoraggio ecografico e ad asportazione chirurgica. Inoltre era stata sottoposta a precedente asportazione di emangioma cutaneo localizzato a livello del gluteo destro.

La paziente non era stata precedentemente sottoposta a terapia con ormone della crescita.

ANDAMENTO ACCRESCITIVO E RISPOSTA ALLA TERAPIA CON GH

Statura alla prima valutazione

Alla valutazione iniziale, la statura media era pari a -2.06 ± 1.11 SDS rispetto alla popolazione generale italiana; il bersaglio staturale familiare (target height, TH) era -0.46 ± 0.93 SDS, e il BMI pari a 0.53 ± 1.22 SDS.

Trentatré pazienti (37.5%) hanno mostrato deficit di GH ai test farmacologici; tra questi, 6 soggetti (26.1%) hanno mostrato un deficit secretivo severo, mostrando 2 test con valori inferiori a 4 ng/ml (Tabella 3.3). Nei pazienti con deficit di GH, la velocità di crescita (GV) prima dell'inizio della terapia era -2.59 ± 1.25 SDS, e i livelli di IGF1 basali pari a -1.97 ± 1.13 SDS (secondo l'età cronologica e il sesso).

	NUMERO PZ	N (media)	% (SD)
Maschi	88	47	53.4
Età gestazionale (settimane)	76	38.57	1.81
Peso alla nascita (gr)	77	3241.1	541.5
Lunghezza alla nascita (cm)	58	49.1	2.4
Nati a termine	76	57	75.0
SGA	88	3	3.4
Target height (SDS Cacciari)	76	-0.46	0.93
Ipotonia	76	15	19.7
Anomalie cardiache	83	63	75.9
<i>Stenosi valvola polmonare</i>	81	29	35.8
<i>DIA</i>	81	24	29.6
<i>DIV</i>	85	3	3.5
<i>Prolasso della valvola mitrale</i>	81	14	17.3
<i>Valvola aortica bicuspid</i>	81	1	1.2
<i>Displasia valvola polmonare</i>	81	14	17.3
Intervento cardiocirurgico	79	16	20.3
Picco Arginina test (ng/mL) v.n. ≥ 10 ng/ml *	31	5.12	2.60
Picco L-dopa test (ng/mL) v.n. ≥ 10 ng/ml *	19	4.38	1.90
Picco Clonidina test (ng/mL) v.n. ≥ 10 ng/ml *	13	5.27	2.14

Tabella 3.3. Caratteristiche cliniche presenti alla nascita o alla valutazione iniziale della coorte di pazienti affetti da RASopatie

Terapia con GH

33 pazienti con deficit di GH rilevato ai test secretivi sono stati trattati con GH biosintetico per un media di 6.76 ± 4.83 anni. Tra questi, il 69.7% presentava una mutazione di PTPN11, seguiti dai pazienti eterozigoti per mutazione di SHOC2 (21.2%). 2 pazienti, affetti da mutazioni in geni associati a rischio di sviluppare cardiomiopatia ipertrofica (p.Thr491Arg, RAF1, p.Gln257Arg, BRAF), hanno ricevuto la terapia con GH prima che l'analisi molecolare fosse disponibile (Tabella 3.1).

Alla *prima valutazione clinica* effettuata presso il nostro Ambulatorio, la statura era inferiore nei pazienti trattati con GH rispetto ai non trattati: -2.82 ± 0.78 DS vs -1.46 ± 1.05 DS per gli standards di crescita di Cacciari e -0.66 ± 0.88 DS vs 0.56 ± 1.22 DS per gli standards per condizione di Ranke, entrambe in modo significativo ($p < 0.001$) al Mann-Whitney test. All'inizio del trattamento, l'età media era pari a 6.94 ± 3.58 anni, e il BMI medio pari a -0.33 ± 1.26 DS.

Dopo il primo anno di terapia con GH, i livelli di IGF1 sono incrementati (DS = -0.08 ± 1.26) ad un valore significativamente più alto (Wilcoxon test: $z = -2.761$, $P = 0.006$), e la velocità di crescita (GV) è anch'essa significativamente aumentata (DS = 1.89 ± 1.52 , $z = -2.66$, $P = 0.008$).

L' *insulino-resistenza*, misurata con l'indice HOMA-R, era pari a 1.17 ± 0.88 all'inizio della terapia con GH e 1.20 ± 0.61 dopo il primo anno di trattamento farmacologico, con un cambiamento non statisticamente significativo ($z = 1.363$, $P = 0.173$) (Tabella 3.4).

	Inizio trattamento (n=31)	Dopo il primo anno (n=26)	Alla statura finale (n=16)
Età (anni)	6.94±3.58	7.72±3.55	18.42±2.25
Altezza (DS Cacciari)	-2.82±0.78	-2.29±0.72	-2.21±0.74
Altezza (DS Ranke)	-0.66±0.88	-0.29±0.84	-0.03±0.69
BMI (DS Cacciari)	-0.33±1.26	-0.69±1.22	-0.48±1.25
IGF1 (DS)	-1.97±1.13	-0.08±1.26	-0.25±1.10
Velocità di crescita (DS)	-2.59±1.25	1.89±1.52	
HOMA-R (DS)	1.17±0.88	1.20±0.61	1.59±0.94

Tabella 3.4. Caratteristiche biometriche e cliniche ai principali end-point temporali per i pazienti affetti da RASopatia trattati con GH

Statura finale nei soggetti trattati e non trattati con GH

La statura finale (FH) è stata raggiunta da 33 pazienti (37.5%), all'età media di 19.48 ± 5.44 anni, ed era pari a -1.78 ± 0.90 DS rispetto alla popolazione generale italiana, e 0.35 ± 0.84 DS rispetto agli standard di Ranke. Tra i pazienti che hanno raggiunto la FH, 16 erano stati trattati con GH per 9.32 ± 3.97 anni (*Figura 3.4*).

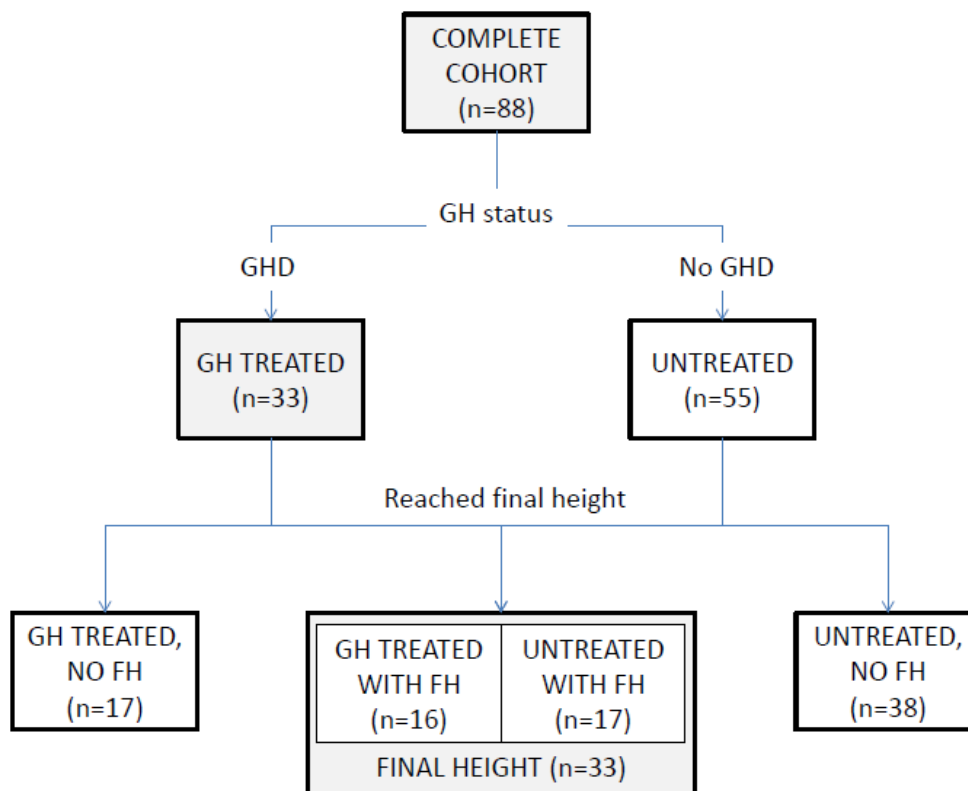


Figura. 3.4. Diagramma della coorte di studio

La FH nei pazienti trattati con GH è risultata inferiore (-2.21 ± 0.74 vs -1.37 ± 0.86 DS, utilizzando gli standard di Cacciari; -0.03 ± 0.69 vs 0.71 ± 0.83 DS, utilizzando gli standard per condizione di Ranke); tale differenza si è rivelata statisticamente significativa al Mann Whitney test di comparazione ($z = 2.738$, $P = 0.006$, standard di Cacciari; $z = 2.576$, $P = 0.010$, Ranke standard).

16 pazienti che hanno raggiunto la FH erano di sesso *femminile* con FH pari a 151.0 ± 5.7 centimetri (-1.89 ± 0.86 DS per gli standard di Cacciari; 0.13 ± 0.91 DS, per gli standard di Ranke). Le 8 femmine trattate hanno raggiunto una FH di 147.8 ± 2.8 centimetri (-2.44 ± 0.42 DS, per gli standard di Cacciari; -0.38 ± 0.36 DS, per gli standard di Ranke), significativamente inferiore alla FH raggiunta dalle femmine non trattate (154.3 ± 6.0 centimetri; $z = 2.25$, $P = 0.027$ per entrambi gli standard di riferimento di Cacciari e Ranke).

I 17 pazienti di sesso *maschile* che hanno raggiunto la statura media più elevata di 165.5 ± 5.8 centimetri (-1.67 ± 0.86 DS per gli standard di Cacciari; 0.55 ± 0.75 DS per gli standard di Ranke). 8 sono stati trattati con GH, e hanno raggiunto una FH di 163.4 ± 6.6 centimetri, inferiore alla FH documentata nei maschi non trattati (167.4 ± 4.4 centimetri), anche se tale differenza non ha raggiunto significatività statistica ($z = 1.347$, $P = 0.178$ per gli standard di Cacciari; $z = 0.915$, $P = 0.360$ per gli standard di Ranke) (Figura 3.6).

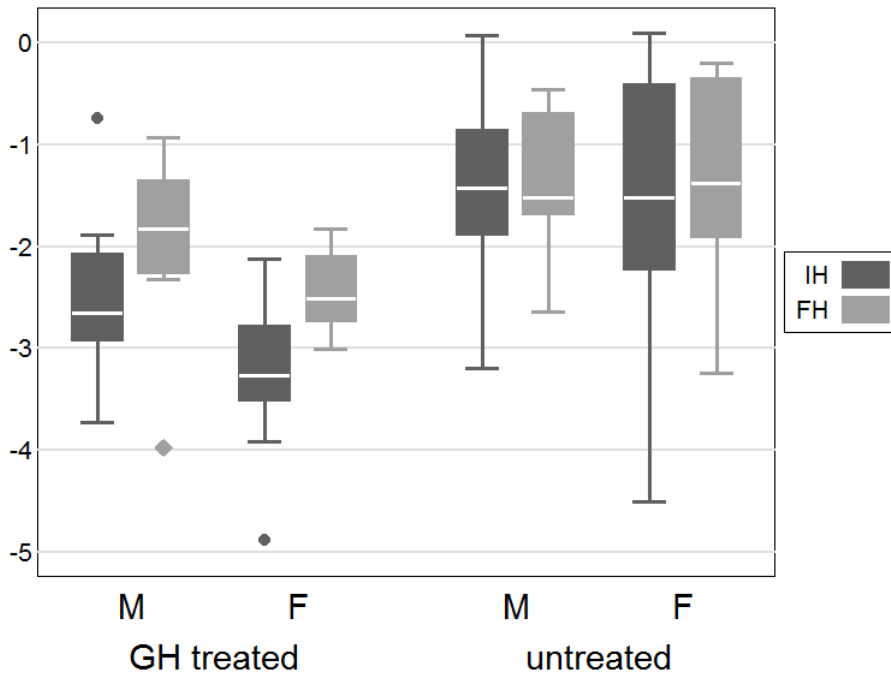


Figura 3.6. Confronto tra altezza iniziale (IH) e finale (FH) tra trattati e non trattati, maschi e femmine. Altezze valutate secondo gli standards Cacciari.

Il confronto tra la FH e il TH è stato possibile per 28 pazienti, con il rilievo di una FH significativamente inferiore rispetto la TH (159.2 ± 9.2 centimetri vs 165.1 ± 8.0 centimetri; $z = -3,746$, $P < 0.001$ al Wilcoxon test utilizzando gli standard in DS di Cacciari). Solo 6 pazienti (21.4%) hanno raggiunto una FH superiore al loro TH. La FH era significativamente inferiore rispetto al TH in tutti i sottogruppi pazienti: GH-trattati (155.6 vs 165.4 centimetri; $P = 0.003$), non trattati (164.1 vs 168.5 centimetri; $P = 0.034$), maschi (165.8 vs 172.4 centimetri; $P = 0.010$) e femmine (151.7 vs 161.1 centimetri; $P = 0.006$).

Il guadagno staturale (HG) misurato in 17 soggetti ai quali la prima valutazione staturale era stata effettuata ad un'età inferiore a 13 anni (femmine) o a 15 anni (maschi) era pari a 0.58 ± 0.87 DS e 0.55 ± 0.92 DS utilizzando gli standards di Cacciari e Ranke, rispettivamente. I pazienti trattati con GH avevano un guadagno staturale di 1.28 DS maggiore dei pazienti non trattati (0.85 vs 0.43 Ranke DS, rispettivamente), significativo al Mann-Whitney Test ($z = -2.378$, $P = 0.017$). La differenza del guadagno staturale medio tra maschi

e femmine non è risultata significativa ($z = -0.0481$, $P = 0.630$) (Tabella 3.4) (Figura 3.6).

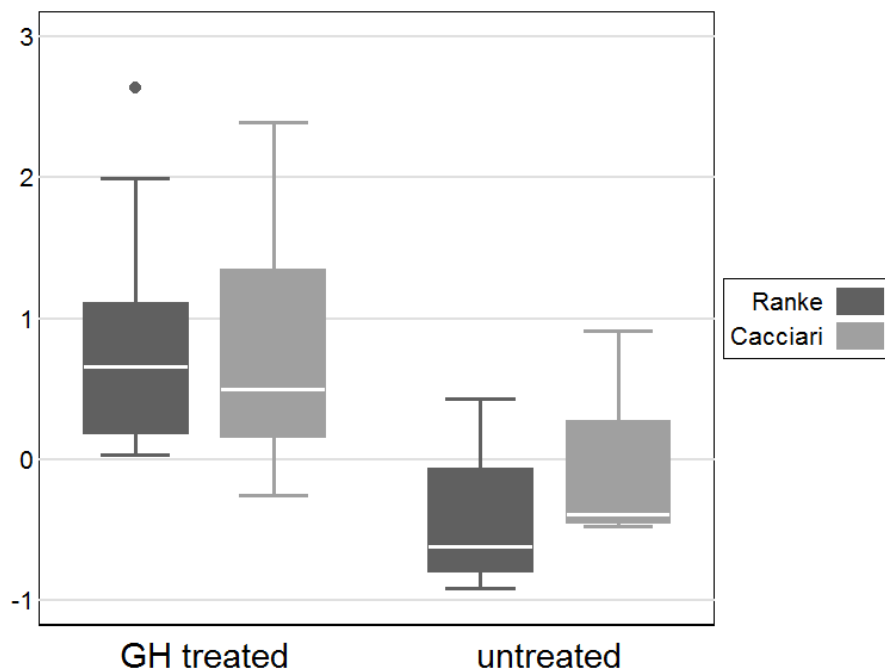


Figura 3.6 Confronto tra guadagno staturale in trattati e non trattati con GH secondo gli standards di Ranke e Cacciari

I pazienti trattati con GH che avevano mostrato un guadagno staturale medio positivo, sono stati sottoposti ad una più lunga durata della terapia con GH (10.5 vs 4.1 anni).

Durante il trattamento con GH, non è stato osservato nessun avanzamento dell'età ossea.

Infine, la *variazione dei livelli di IGF1* è stata valutata nei 6 pazienti che avevano a disposizione entrambe le misurazioni di tale parametro, all'inizio della terapia e al raggiungimento della FH. Il valore di IGF1 è incrementato da - 2.43 a 0.27 DS.

Nel nostro studio i due gruppi affetti da RASopatie maggiormente rappresentati sono i pazienti PTPN11 mutati e SHOC2 mutati. Nella tabella 3.5 sono riportate le caratteristiche cliniche e i risultati terapeutici di questi due sottogruppi maggiori: al raggiungimento della FH, i 3 soggetti SHOC2 mutati hanno mostrato guadagno staturale maggiore di 1 DS rispetto ai 10 pazienti PTPN11 mutati.

CARATTERISTICHE CLINICHE DEI SOGGETTI GH TRATTATI, IN FUNZIONE DEL GENOTIPO	PTPN11 (*)	SHOC2 (**)
Età alla prima valutazione (anni)	7.45±3.58	5.17±2.62
Statura alla prima valutazione (SDS Cacciari)	-2.53±0.65	-3.45±0.84
Statura alla prima valutazione (SDS Ranke)	-0.44±0.75	-1.10±1.14
Statura alla valutazione finale (SDS Cacciari)	-1.98±0.64	-2.34±0.14
Statura alla valutazione finale (SDS Ranke)	0.17±0.67	-0.20±0.21
Guadagno staturale (SDS Cacciari)	0.51±0.71	1.38±1.21
Guadagno staturale (SDS Ranke)	0.42±0.71	1.55±1.35
IGF alla prima valutazione (SDS)	-1.76±1.24	-2.62±0.51
IGF alla valutazione (SDS)	-0.85±0.91	0.09±1.25
Velocità di crescita pre-terapia (SDS)	-2.76±1.75	-2.42±0.56
Velocità di crescita dopo il primo anno di tp(SDS)	7.88±1.91	8.80±1.39

(*) n=23 alla prima valutazione; n=10 alla valutazione finale

(**) n=7 alla prima valutazione; n=3 alla valutazione finale

Tab. 3.5. Confronto tra le caratteristiche cliniche e i risultati terapeutici dei pazienti trattati con GH in relazione ai principali genotipi (PTPN11 vs SHOC2)

Proporzioni corporee e trattamento con GH

Per quanto riguarda le proporzioni corporee, la statura seduta (SH) è risultata pari a -3.19 ± 1.32 DS all'inizio del trattamento e -2.68 ± 1.01 a raggiungimento della FH; per 7 pazienti con avevano entrambe le misure disponibili, la differenza di SH è risultata significativa ($z = 2.197$, $P = 0.028$). La lunghezza degli arti inferiori sub-ischiatica (SLL) è risultata essere pari a -2.58 ± 1.05 all'inizio del trattamento e -1.83 ± 0.74 alla FH; per i 10 pazienti che avevano entrambe le misure, la differenza in SLL era significativa ($z = -2.090$, $P = 0.037$). Il rapporto tra SH e SLL è risultato pari a 1.26 ± 0.18 al basale e 1.12 ± 0.03 alla FH. La differenza nel rapporto non è risultata significativa in altri 8 pazienti ($z = 1.26$, $P = 0.208$) che avevano entrambe le misure.

Sviluppo puberale

Il picco di velocità di crescita (PHV) stimata utilizzando il modello 1 di Preece e Baines è stata valutata in 11 pazienti trattati con GH (4 femmine e 7 maschi), mostrando un picco medio di 6.50 ± 1.46 centimetri / anno.

Il PHV è risultato inferiore per le femmine (6.14 ± 1.95) rispetto ai maschi (6.70 ± 1.24), con una differenza non significativa ($z = -0.945$, $P = 0.345$).

L'età di raggiungimento del PHV era significativamente inferiore ($z = -2.457$, $P = 0.014$) per le femmine (11.9 anni) rispetto ai maschi (14.6 anni).

La Figura 3.7 mostra l'andamento accrescitivo individuale per maschi e femmine. I maschi hanno raggiunto il loro PHV in un punto centrale della loro traiettoria di crescita, mentre le femmine lo hanno raggiunto nella prima fase di crescita puberale.

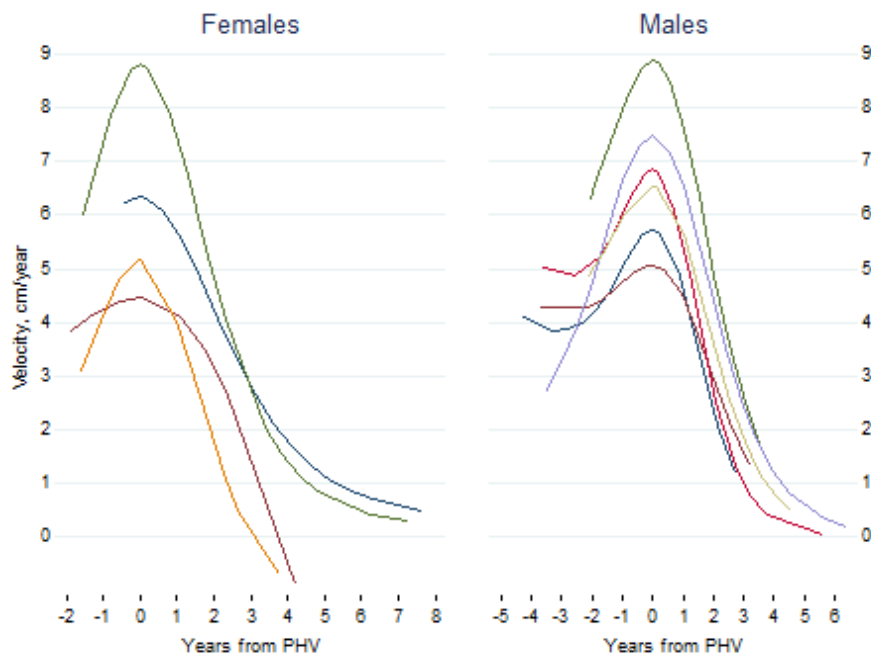


Fig. 3.7. Curve di velocità di crescita (HV) individuali per le femmine e maschi tracciate in base al loro picco di velocità di crescita (PHV). I maschi raggiungono la loro PHV in un punto centrale della loro traiettoria di crescita, mentre le femmine in fase precoce. Un picco smorzato e ritardo è stato osservato in particolare nei maschi.

3.4 DISCUSSIONE

Nella maggior parte dei pazienti della nostra coorte affetti da RASopatie, l'adattamento neonatale è risultato normale e sono stati osservati adeguati parametri accrescitivi al momento della nascita.

La distribuzione per genotipo ha mostrato una prevalenza superiore al 50% dei soggetti PTPN11 mutati nella coorte, confermando tale gene il più frequentemente coinvolto.

Gli elementi fenotipici caratterizzanti le Rasopatie si sono confermati essere gli occhi, le orecchie e la regione del collo; i pazienti con mutazioni in geni differenti da PTPN11 hanno mostrato segni faciali più grossolani (maggior ricorrenza di prognatismo e macrocefalia). E' stata inoltre confermata, come noto in letteratura, l'elevata frequenza di cardiopatie, superiore al 70% dei casi. L'analisi retrospettiva della risposta alla terapia con GH ha mostrato alla prima valutazione che i pazienti con deficit secretivo di GH presentavano statura inferiore agli standard per la popolazione generale italiana e alla loro TH, e statura inferiore di 1 SDS rispetto gli standard per condizione.

Circa il 37% il della nostra intera coorte presentava bassa statura, GHD ai test di stimolo farmacologici, e livelli molto bassi di IGF1 (meno di 2 SDS rispetto la popolazione generale); questi pazienti sono stati trattati con GH a dosaggio standard approvati per i bambini con GHD isolato.

Nei soggetti che hanno avviato la terapia prima della pubertà, la terapia con GH a lungo termine ha mostrato un miglioramento della statura finale di 1.28 DS rispetto ai non trattati, in accordo con dati precedentemente pubblicati [Dahlgren et al., 2009].

I nostri dati indicano che la terapia con GH, nei soggetti con RASopatia e deficit secretivo, sembra normalizzare la loro statura per condizione secondo gli standard di Ranke, permettendo loro di avvicinarsi alla statura del gruppo di pazienti non trattato con normale

secrezione di GH, anche se la loro FH rimane al di sotto del bersaglio staturale parentale e inferiore agli standard italiani di riferimento. Tale risultato terapeutico è sostenuto dal rilievo di livelli di IGF1 aumentati significativamente dopo il primo anno di terapia e che hanno raggiunto valori normali alla FH, benchè si sia avuto a disposizione un numero limitato di pazienti con tale parametro biochimico disponibile ad inizio e fine terapia.

Durante il trattamento con GH, non è stato osservato un significativo cambiamento dell'età ossea, e il rapporto SH / SLL è rimasto stabile, con nessuna variazione nelle proporzioni corporee. Per quanto riguarda il metabolismo del glucosio, l'HOMA-R è rimasto invariato. Inoltre, non abbiamo osservato un deterioramento della funzione cardiaca e lo sviluppo di cardiomiopatia ipertrofica.

Nei pazienti con NS lo sviluppo puberale è tipicamente ritardato, anche se non in tutti i soggetti [Romano et al., 2009]. Nel nostro sottogruppo di 12 soggetti che hanno raggiunto la FH dopo trattamento con GH, l'andamento accrescitivo in epoca puberale ha mostrato un picco smorzato, in particolare nei maschi, e un ritardo nell'avvio spontaneo della pubertà di circa 6 mesi rispetto alla popolazione generale [Tanner et al., 1985]. Il ritardo dell'avvio dello sviluppo puberale e il ridotto picco accrescitivo potrebbero spiegare il raggiungimento di una ridotta FH.

I nostri pazienti hanno beneficiato della terapia GH se il trattamento farmacologico è stato avviato in pre-pubertà ed è stato somministrato per lungo tempo. Probabilmente, l'inizio in epoca prepuberale del trattamento con GH potrebbe compensare l'inappropriato scatto di crescita puberale. La valutazione del comportamento in epoca puberale in una più ampia coorte di pazienti senza deficit di GH potrebbe chiarire questo aspetto.

Un limite importante di questo studio riguarda l'uso del dosaggio standard di GH previsto per i GHD, rispetto alle alte dosi utilizzate in altre sindromi malformative. Inoltre, il numero limitato di pazienti

trattati con GH non consente un'analisi accurata della correlazione tra i singoli genotipi e la risposta alla terapia.

Infine, in più di un terzo dei soggetti sono stati osservati ritardo cognitivo, disturbi dell'attenzione o deficit visuo-spaziali, mentre non è emersa nella nostra casistica un'aumentata suscettibilità neoplastica.

3.5 CONCLUSIONI

Il nostro studio ha confermato le caratteristiche fenotipiche e accrescitive riportate in letteratura in pazienti affetti da RASopatie e ha soprattutto dimostrato che la terapia con GH a lungo termine determina una risposta staturale positiva in soggetti affetti da RASopatia e GHD, normalizzando la FH per gli standard per condizione di Ranke, anche se i pazienti non hanno mostrato il caratteristico recupero accrescitivo tipico dei soggetti con GHD isolato. Come in molte malattie genetico-malformative, il timing di sviluppo puberale potrebbe aver influito negativamente sul picco di crescita puberale e sulla FH. L'esclusivo deficit di GH non spiega però la bassa statura osservata nelle RASopatie. Ulteriori studi su modelli sperimentali in vitro e in vivo saranno necessari per comprendere le cause di bassa statura in queste patologie, incluso il ruolo regolatorio complesso esercitato da RAS e dalla cascata MAPK sul segnale GH / IGF.

Saranno pertanto necessari ulteriori studi randomizzati sulla terapia con GH, lo sviluppo puberale e i dati di FH in pazienti affetti da RASopatia rispetto a pazienti-controllo non trattati, per confermare l'utilità e la sicurezza della terapia con GH in soggetti con o senza GHD.

BIBLIOGRAFIA

Abe Y et al 2012 *Prevalence and Clinical Feature of Costello Syndrome and Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome in Japan: findings from a Nationwide Epidemiological Survey* Am J Med Genet Part A 158:1083-1094

Adachi M, Abe Y, Aoki Y, Matsubara Y 2012 *Epilepsy in RAS/MAPK syndrome: two cases of cardio-facio-cutaneous syndrome with epileptic encephalopathy and a literature reviews* Seizure 55-60

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

Alanay Y, Balç S, Ozen S 2004 *Noonan syndrome and systemic lupus erythematosus: Presentation in childhood* Clin Dysmorphol 13:161–163

Alfieri P et al 2011 *Long term Memory Profile of Disorder associated with dysregulation of the RAS-MAPK Signaling Cascade* Behav Genet 41: 423-429

Allanson JE 2007 *Noonan syndrome* Am J Med Genet C Semin Med Genet 145C:274–279

Allanson JE et al 2011 *Cardio-facio-cutaneous syndrome: Does genotype predict phenotype?* Am J Med Genet C Semin Med Genet 2011 May 15; 157(2): 129–135

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

Aoki Y et al 2008 *The RAS/MAPK, Syndrome: Novel Roles of the RAS pathway in Human Genetic Disorders* Human Mutation 29(8) 992-1006; 143A:1481–8

Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, and Matsubara Y 2013 *Gain-of-Function Mutations in RIT1 Cause Noonan Syndrome, a RAS/MAPK Pathway Syndrome* The American Journal of Human Genetics 93, 173–180

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

Armour CM, Allanson JE 2008 *Further delineation of cardio-facio-cutaneous syndrome: clinical features of 38 individuals with proven mutations* J Med Genet 45:249–254

Axelrad ME, Schwartz DD, Katzenstein JM, Hopkins E, Gripp KW 2011 *Neurocognitive, adaptive, and behavioral functioning of*

individuals with Costello syndrome: a review Am J Med Genet C Semin Med Genet 157:115–22

Baldassarre G, Mussa A, Dotta, A, Banaudi E, Forzano S, Marinosci A, Rossi C, Tartaglia M, Silengo M, Ferrero G.B 2011 *Prenatal features of Noonan syndrome: prevalence and prognostic value* Prenat Diagn 31: 949-954

Baraitser M, Patton MA 1986 *A Noonan-like short stature syndrome with sparse hair* J Med Genet 23:161–4

Benacerraf B, Greene M, Holmes L 1989 *The prenatal Sonographic features of Noonan's syndrome* J Ultrasound Med 8: 59–63

Beneteau C, Cavé H, Moncla A et al 2009 *SOS1 and PTPN11 mutations in five cases of Noonan syndrome with multiple giant cell lesions* European Journal of Human Genetics 17: 1216–1221

Bertola DR, Yamamoto GL, Almeida TF et al. 2014 *Further evidence of the importance of RIT1 in Noonan syndrome* Am J Med Genet 164 (11): 2952–2957

Binder G, Neuer K, Ranke MB, Wittekindt NE 2005 *PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan Syndrome* J Clin Endocrin and Metab 90:5377-5381

Bottner F, Sandmann C, Semik M, Ramm O, Winkelmann W, Liljenqvist U 2005 *Chylothorax after surgery for thoracic deformity in Noonan syndrome* Orthopedics 28:71-73

Brems H, Chmara M, Sahbatou M et al 2007 *Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype* Nat Genet 39:1120–1126

Burch M, Sharland M, Shinebourne E, Smith G, Patton M, McKenna W 1993 *Cardiologic abnormalities in Noonan syndrome: Phenotypic diagnosis and echocardiographic assessment of 118 patients* J Am Coll Cardiol 22:1189–1192

Cacciari E, Milani S, Balsamo A, Spada E, Bona G, Cavallo L, Cerutti F, Gargantini L, Greggio N, Tonini G, Cicognani A. 2006. *Italian crosssectional growth charts for height, weight and BMI (2 to 20 yr).* J Endocrinol Invest 29:581–593

Capalbo D et al 2012 *Noonan-like syndrome with loose anagen hair associated with growth hormone insensitivity and atypical neurological manifestation* Am J Med Genet Part A 158°:856-860

Chen PC, Yin J, Yu HW et al. 2014 *Next-generation sequencing identifies rare variants associated with Noonan syndrome* Proc Natl Acad Sci USA 111 (31): 11473–11478

Choi WW, Yoo JY, Park KC, Kim KH 2003 *Leopard syndrome with a new association of congenital corneal tumor, choristoma* Pediatr Dermatol 20:158-60

Choong K, Freedman MH, Chitayat D, Kelly EN, Taylor G, Zipursky A 1999 *Juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome* J Pediatr Hematol Oncol 21: 523–527

Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R et al 2010 *A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome* Nature Genetics 42: 27–29

Coppin BD, Temple IK 1997 *Multiple lentiginos syndrome LEOPARD syndrome or progressive cardiomyopathic lentiginosis* J Med Genet 34:582–6

Cordeddu V et al. 2015 Activating Mutations Affecting the Dbl Homology Domain of SOS2 Cause Noonan Syndrome. Human Mutation 0:1–8

Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA et al 2009 *Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair* Nat Genet 41:1022–1026

Cotterill AM, McKenna WJ, Brady AF et al 1996 *The short-term effects of growth hormone therapy on height velocity and cardiac ventricular wall thickness in children with Noonan's syndrome* J Clin Endocrinol Metab 81(6):2291-7

Dahlgren J. 2009. GH Therapy in noonan syndrome. Horm Res 72:46–48

De Haan M, vd Kamp JJ, Briet E, Dubbeldam J 1988 *Noonan syndrome: partial factor XI deficiency* Am J Med Genet 29(2):277-282

De Rocca Serra-Nédélec A, Edouard T et al 2012 *Noonan syndrome-causing SHP2 mutants inhibit insulin-like growth factor I release via growth hormone-induced ERK hyperactivation, which contributes to short stature* PNAS 109(11) :4257-4262

Della Marca G, Vasta I, Scarano E et al 2006 *Obstructive sleep apnea in Costello syndrome* Am J Med Genet A.;140:257–62

Delrue MA, Chateil JF, Arveiler B, Lacombe D 2003 Costello syndrome and neurological abnormalities. *Am J Med Genet A* 123A:301–5

Denayer E, Chmara M, Brems H, Kievit AM, van Bever Y et al 2011 *Legius syndrome in fourteen families* *Hum Mutat* 32:E1985–E1998

Denayer E, Descheemaeker MJ, Stewart D R, Keymolen K et al 2011 *Observations on Intelligence and Behavior in 15 Patients with Legius Syndrome* *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 15; 157(2): 123–128

Der Kaluostian VM et al 1991 *Costello Syndrome* 41(1): 69-73
Am J Med Genet

Derbent M, Oncel Yekta, Tokel K, Varan B, Haberal A, Yazici A.C, Legius E, Ozbek E 2010 *Clinical and hematologic findings in Noonan syndrome patients with PTPN11 gene mutations* *Am J Med Genet Part A* 152A:2768-2774

Digilio MC, Sarkozy A, de Zorzi A, Pacileo G, Limongelli G, Mingarelli R, Calabro R, Marino B, Dallapiccola B 2006 *LEOPARD syndrome: clinical diagnosis in the first year of life* *Am J Med Genet A* 140:740–6

Dileone M, Zampino G et al 2012 *Dystonia in Costello syndrome* Parkinsonism and related disorder 18:798-800

Duenas DA, Preissig S, Summitt RL, Wilroy RS, Lemmi H, Dews JE 1973 *Neurologic manifestations of Noonan syndrome* *South Med J* 66(2):193–196

Estep AL, Tidyman WE, Teitell MA, Cotter PD, Rauen KA 2006 *HRAS mutations in Costello syndrome: detection of constitutional activating mutations in codon 12 and 13 and loss of wild-type allele in malignancy* Am J Med Genet A 140:8–16

Fasano S, Brambilla R 2011 *Ras-ERK Signaling in Behavior: Old Questions and New Perspectives* Frontiers in Behavioral Neuroscience, 79(5):1-6

Ferreira LV, Souza ALS, Arnhold IJP, Mendoca BB, Jorge AAL 2005 *PTPN11 (Protein tyrosine phosphatase non receptor type 11) mutations and response to growth hormone therapy in children with Noonan Syndrome* J Clin Endocrinol and Metabol 90/9/5156

Franceschini P, Licata D, DiCara G, Guala A, Bianchi M, Ingrosso G, Franceschini D 1999 *Bladder carcinoma in Costello syndrome: Report on a patient born to consanguineous parents and review* Am J Med Genet 86:174–179

Gelb D.B, Tartaglia M 2011 *RAS signaling pathway mutations and hypertrophic cardiomyopathy: getting into and out of the tick of it* J Clin Invest 21(3):844-7

Gorlin RJ, Anderson RC, Blaw M 1969 *Multiple lentigenes syndrome* Am J Dis Child 117:652–62

Gos M, Fahiminiya S, Poznański J et al. 2014 *Contribution of RIT1 mutations to the pathogenesis of Noonan syndrome: four new cases and further evidence of heterogeneity* Am J Med Genet 164 (9): 2310–2316

Gripp KW 2005 *Tumor predisposition in Costello syndrome* Am J Med Genet C Semin Med Genet 137C:72–77

Gripp KW et al 2011 *Phenotypic Analysis of individuals with Costello syndrome due to HRAS p.G13C* Am J Med Genet Part A 155:706-716

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

Gripp KW, Innes AM, Axelrad ME et al 2008 *Costello syndrome associated with novel germline HRAS mutations: an attenuated phenotype?* Am J Med Genet A.15;146A(6):683-90

Gripp KW, Scott CI Jr, Nicholson L, Figueroa TE 2000 *A second case of bladder carcinoma in a patient with Costello syndrome* Am J Med Genet 90:256-259

Hennekam RC 2003 *Costello syndrome: an overview* Am J Med Genet C Semin Med Genet 117C:42-48

Herman TE, McAlister WH 2005 *Gastrointestinal and renal abnormalities in cardio-facio-cutaneous syndrome* Pediatr Radiol 35:202-5

Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE 1998 *Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2* Cell 92:441-450

Jamieson CR, van der Burgt I, Brady AF et al 1994 *Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12* Nat Genet 8(4):357-360

Johnson J-P et al 1998 *Costello syndrome: Phenotype, natural history, differential diagnosis, and possible cause* The Journal of Pediatrics 133(3) 441-448

Jongmans M, Otten B, Noordam K, van der Burgt I 2004 *Genetics and variation in phenotype in Noonan syndrome* Horm Res. 62(suppl 3):56–59

Kavamura MI, Pomponi MG, Zollino M, Lecce R, Murdolo M, Brunoni D, Alchorne MM, Opitz JM, Neri G 2003 *PTPN11 mutations are not responsible for the cardiofaciocutaneous syndrome* Eur J Hum Genet 11:64–8

Keilhack H, David FS, McGregor M et al 2005 *Diverse biochemical properties of shp2 mutants. Implications for disease phenotypes* The Journal of Biological Chemistry 280: 30984–30993

Kerr B, Delrue MA, Sigaudy S et al, 2006 *Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases* J Med Genet 43:401–5

Kerr B, Einaudi MA, Clayton P, Gladman G, Eden T, Saunier P, Genevieve D, Philip N 2003 *Is growth hormone treatment beneficial or harmful in Costello syndrome?* [letter] J Med Genet 40:e74

Kirk JM, Betts PR, Butler GE, Donaldson MD, Dunger DB, Johnston DI, Kelnar CJ, Price DA, Wilton P 2001 *Short stature in Noonan syndrome: response to growth hormone therapy* Arch Dis Child 84:440-443

Koenighofer M, Hung C.Y, McCauley J.L, Dallman J, Back E.J, Mihalek I, Gripp K.W, Sol-Church K, Rusconi P, Zhang

Z, Shi G.-X, Andres D.A, Bodamer O.A 2015 *Mutations in RIT1 cause Noonan syndrome – additional functional evidence and expanding the clinical phenotype* Clin Genet

Komoda et al 2003 *Osteofibrous dysplasia in a Japanese boy with Costello syndrome* Clin Dysmorphol 12(3):211-2

Koudova M, Seemanova E, Zenker M 2009 *Novel BRAF mutation in a patient with LEOPARD syndrome and normal intelligence* Eur J Med Genet 52:337–40

Kratz C, Rapisuwon, Reed H, Hasle H, Rosenberg P.S 2011 *Cancer in Noonan, Costello, Cardiofaciocutaneous and LEOPARD Syndromes* Am J Med Genet C Seminar 15 157(2):83-89

Lee CK, Chang BS, Hong YM, Yang SW, Lee CS, Seo JB 2001 *Spinal deformities in Noonan syndrome: a clinical review of sixty cases* J Bone Joint Surg Am 83-A:1495–1502

Lee DA, Portnoy S, Hill P, Patton MA 2005 *Psychological profile of children with Noonan syndrome* Dev Med Child Neurol 47(1):35–38

Lee KA, Williams B, Roza K, et al 2009 *PTPN11 analysis for the prenatal diagnosis of Noonan syndrome in fetuses with abnormal ultrasound findings* Clin Genet 75:190–194

Lee NB, Kelly L, Sharland M 1992 *Ocular manifestations of Noonan syndrome* Eye 6:328-334

Lee P.A, Ross J, Germak J.A, Gut R 2012 *Effect of 4 years of growth hormone therapy in children with Noonan syndrome in the American norditropin studies: Web-enabled research (ANSWER)*

program(R) registry International Journal of Pediatric Endocrinology 15

Legault L, Gagnon C, Lapointe N 2001 Growth hormone deficiency in ostello syndrome: A possible explanation for the short stature. *J Pediatr* 138:151–152

Leicht DT, Balan V, Kaplun A et al 2007 *Raf kinases: function, regulation and role in human cancer* *Biochimica et biophysica acta* 1773: 1196–1212

Lepri F, De Luca A, Stella L et al 2011 *SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype phenotype correlations* *Hum Mutat* 32:1–13

Limal JM, Parfait B, Cabrol S et al *Noonan syndrome: relationships between genotype, growth, and growth factors* *J Clin Endocrinol Metab* 2006 91(1):300-6

Limongelli G, Pacileo G, Marino B, Digilio MC et al 2007 *Prevalence and clinical significance of cardiovascular abnormalities in patients with the LEOPARD syndrome* *Am J Cardiol* 100:736–41

Lin A.E et al 2009 *Prenatal features of Costello syndrome: ultrasonographic findings and atrial tachycardia* *Prenat Diagn* 29: 682–690

Lin A.E et al 2011 *Clinical, Pathological, and molecular analyses of cardiovascular abnormalities in Costello syndrome: A RAS/MAPK pathway syndrome* *Am J Med Genet part A* 486-507

- Lo IF, Brewer C, Shannon N, Shorto J, Tang B, Black G, Soo MT, Ng DK, Lam ST, Kerr B** 2008 *Severe neonatal manifestations of Costello syndrome* J Med Genet 45:167-71
- Lopez-Rangel E, Malleson PN, Lirenman DS, Roa B, Wiszniewska J, Lewis ME** 2005 *Systemic Lupus Erythematosus and other autoimmune disorders in children with Noonan Syndrome* Am J Med Genet Part A 139A:239–242
- Malumbres M, Barbacid M.** 2003 RAS oncogenes: the first 30 years Nat Rev Cancer 3:459–465
- Marcus KA, Sweep CG, van der Burgt I, Noordam C** 2008 *Impaired Sertoli cell function in males diagnosed with Noonan syndrome* J Pediatr Endocrinol Metab 21: 1079–1084
- Marin T.M et al** 2011 *Rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model of LEOPARD syndrome-associated PTPN11 mutation* The Journal of Clinical Investigation 121(3) 1026-1043
- Marino B, Digilio MC, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B** 1999 *Congenital heart diseases in children with Noonan syndrome: An expanded cardiac spectrum with high prevalence of atrioventricular canal* J Pediatr, 135:703-706
- Martin RA, Jones KL** 1991 *Delineation of the Costello syndrome* Am J Med Genet 41(3):346-9
- Martinelli S, De Luca A, Stellacci E et al** 2010 *Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype* American Journal of Human Genetics 87: 250–257

Massarano AA, Wood A, Tait RC, Stevens R, Super M 1996 *Noonan syndrome: coagulation and clinical aspects* Acta Paediatr, 85:1181-1185

Mazzanti L, Cacciari E, Cicognani A, et al 2006 *Noonan-like syndrome with loose anagen hair: a new syndrome?* Am J Med Genet A 118A:279–286

Mazzanti L, Tamburrino F, Scarano E, Perri A, Vestrucci B, Guidetti M, Rossi C, Tartaglia M 2013 *GH Therapy and first final height data in Noonan-like syndrome with loose Anagen hair (Mazzanti syndrome).* Am J Med Genet Part A 161A:2756–2761

McDaniel CH, Fujimoto A 1997 *Intestinal malrotation in a child with cardio-faciocutaneous syndrome* Am J Med Genet 70:284–6

Merks JH, Caron HN, Hennekam RC 2005 *High incidence of malformation syndromes in a series of 1.073 children with cancer* Am J Med Genet A 134(2):132-43

Messiaen L, Yao S, Brems H et al 2009 *Clinical and mutational spectrum of neurofibromatosis type 1-like syndrome* JAMA 302: 2111–2118

Mitin N, Rossman KL, Der CJ 2005 *Signaling interplay in Ras superfamily function* Current Biology 15: R563–574

Moroni I, Bedeschi F, Luksch R, Casanova M, D'Incerti L, Uziel G, Selicorni A 2000 *Costello syndrome: a cancer predisposing syndrome?* Clin Dysmorphol. 9(4):265-8

Municchi G, Pasquino AM, Pucarelli I, Cianfarani S, Passeri F 1995 *Growth hormone treatment in Noonan syndrome: report of four cases who reached final height* Horm Res 44(4):164-7

Muram-Zborovski TM, Stevenson DA, Viskochil DH, Dries DC, Willson AR, Mao R 2010 *SPRED1 mutations in a neurofibromatosis clinic* J Child Neurol 25:1203–1209

Nava C, Hanna N, Michot C et al 2007 *Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype phenotype relationships and overlap with Costello syndrome* Journal of Medical Genetics 44: 763–771

Neumann TE, Allanson J, Kavamura I et al *Multiple giant cell lesions in patients with Noonan syndrome and cardiofacio-cutaneous syndrome* European Journal of Human Genetics 2009 17: 420–425

Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH et al 2010 *Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia* Nature Genetics 42: 794–800

Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G et al 2006 *Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome* Nat Genet 38:294–6

Noonan J 2005 *Noonan syndrome and related disorders* Prog Pediatr Cardiol 20:177–85

Noonan J 2006 *Noonan syndrome and related disorders: alteration in growth and puberty* Rev Endocr Metab Disord 7(4):251-5

Noonan J, Raaijmakers R, Hall DB 2003 *Adult height in Noonan syndrome* Am J Med Genet 123A:68-71

Noonan JA 1968 *Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease* Am J Dis Child 116:373–380

Noonan JAE 1963 *Associated noncardiac malformation in children with congenital heart disease* J Pediatr 63:468

Noordam C, Peer PG, Francois I, De Schepper J, van den Burgt I, Otten BJ 2008 *Long-term GH treatment improves adult height in children with Noonan syndrome with and without mutations in protein tyrosine phosphatase, non-receptor-type 11* Eur J Endocrinol 159:203–208

Noordam CM, van der Burgt I, Sweep CG, Delemarre-van de Waal HA, Sengers RC, Otten BJ 2001 *Growth hormone secretion in children with Noonan Syndrome: frequently abnormal without consequences for growth or response to GH treatment* Clin Endocrinol (Oxf) 54:53-59

Nora JJ, Nora AH, Sinha AK, Spangler RD, Lubs HA 1974 *The Ullrich –Noonan Syndrome (Turner phenotype)* Am J dis Child 127:48-55

Ohtake A, Aoki Y, Saito Y, Niihori T, Shibuya A, Kure S, Matsubara Y 2010 *Non-Hodgkin lymphoma in a patient with cardiofaciocutaneous syndrome* J Pediatr Hematol Oncol

Opitz JM 1985 *The Noonan syndrome* Am J Med Genet 21(3):515–518

Osio D, Dahlgren J, Albertsson Wikland K, Westphal O 2005 *Improved final height with long-term growth hormone treatment in Noonan syndrome* Acta Paediatr 94:1232–1237

Otten J, Noordam K 2007 *Short stature in Noonan Syndrome: Results of Growth Hormone Treatment* Growth Hormone in Pediatrics – 20 years of KIGS 347-355

Padidela R, Camacho-Hübner C, Attie KM, Savage MO 2008 *Abnormal Growth in Noonan Syndrome: Genetic and Endocrine Features and Optimal Treatment* Horm Res 70:129–136

Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA et al 2007 *Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy* Nature Genetics; 39: 1007–1012

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

Pérez B, Mechinaud F, Galambrun C et al 2010 *Germline mutations of the CBL gene define a new genetic syndrome with predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia* Journal of Medical Genetics 47: 686–691

Pergament E, Alamillo C, Sak K et al 2011 *Genetic assessment following increased nuchal translucency and normal karyotype* Prenat Diagn 31:307–310

Perundurai S.D et al 2011 *Cyclosporine attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by RAF1 mutants in Noonan and LEOPARD syndrome* Journal of Molecular and cellular cardiology 51: 4-15

Preece MA, Baines MJ 1978 A new family of mathematical models describing the human growth curve. *Ann Hum Biol* 5:1–24.

Qiu WW, Yin SS, Stucker FJ 1998 *Audiologic manifestations of Noonan syndrome* *Otolaryngol Head Neck Surg* 118:319-323

Quaio C, Carvalho JF, da Silva CA, Bueno C, Brasil AS, Pereira AC, Jorge AA, Malaquias AC, Kim CA, Bertola DR 2012 *Autoimmune disease and multiple autoantibodies in 42 patients with RASopathies* *Am J Med Genet part A* 158°: 1077-1082

Ranke MB, Heidemann P, Knupfer C, Enders H, Schmaltz AA, Bierich JR 1988 *Noonan syndrome: growth and clinical manifestations in 144 cases* *Eur J Pediatr* 148:220-227

Rauen K 2013 *The Rasopathies*. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* 14:355-369

Rauen KA 2010 *Cardiofaciocutaneous syndrome* In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [internet]

Rauen KA, Tidyman WE, Estep AL, Sampath S, Peltier HM, Bale SJ, Lacassie Y 2010 *Molecular and functional analysis of a novel MEK2 mutation in cardio-facio-cutaneous syndrome: transmission through four generations* *Am J Med Genet A* 152A(4):807–14

Reinker RA, Stevenson DA, Tsung A 2011 *Orthopaedic conditions in Ras/MAPK related disorders* *J Pediatr Orthop*

Reynolds JF, Neri G, Herrmann JP, Blumberg B, Coldwell JG, Miles PV, Opitz JM 1986 *New multiple congenital*

anomalies/mental retardation syndrome with cardio-facio-cutaneous involvement—the CFC syndrome Am J Med Genet 28:413–27

Roberts A, Allanson J, Jadiko S K, Kavamura M I, Opitz J M, Youg T, Neri G 2006 *The cardiofaciocutaneous syndrome* J Med Genet 43:833-842

Roberts AE, Araki T, Swanson KD et al 2007 *Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome* Nature Genetics 39: 70–74

Rodriguez-Viciano P, Tetsu O, Tidyman WE et al 2006 *Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome* Science 311:1287–90

Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J et al 2010 *Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines* Pediatrics 126: 746–759

Romano AA, Blethen SL, Dana K, Noto RA 1996 *Growth hormone treatment in Noonan syndrome: the National Cooperative Growth Study experience* J Pediatr 128:S18–S21

Romano AA, Dana K, Bakker B, Davis DA, Hunold JJ, Jacobs J, Lippe B 2009 *Growth Response, Near-Adult Height, and Patterns of Growth and Puberty in Patients with Noonan Syndrome Treated with Growth Hormone* J Clin Endocrinol Metab 94:2338–2344

Sarkozy A, Carta C, Moretti S et al 2009 *Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum* Human Mutation 30: 695–702

Sarkozy A, Conti E, Seripa D, Digilio MC et al 2003 *Correlation between PTPN11 gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes* J Med Genet 40:704-8

Sarkozy A, Digilio M.C, Dallapiccola B 2008 *Leopard syndrome* Orphanet Journal of Rare Diseases 3:13

Sayers A, Baines M, Tilling K. 2013. *A new family of mathematical models describing the human growth curve—Erratum: Direct calculation of peak height velocity, age at take-off and associated quantities.* Ann Hum Biol 40:298–299

Sayers A 2013 *PBREG: Stata module to fit the Preece and Baines (1978) family of growth curves and age, height, and velocity at peak* *height* *velocity*
<http://ideas.repec.org/c/boc/bocode/s457612.html>

Schluter G, Steckel M, Schiffmann H et al 2005 *Prenatal DNA diagnosis of Noonan syndrome in a fetus with massive hygroma colli, pleural effusion and ascites* Prenat Diagn 25: 574–576

Schrader KA et al 2009 *Multiple granular cell tumors are an associated feature of LEOPARD syndrome caused by a mutation in PTPN11* Clin Genet 75:185-189

Sebolt J.S, Herrera R 2004 *Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer* Nature Reviews Cancer 4:937-947

Shah N, Rodriguez M, St Louis D, Lindley K, Milla PJ 1999 *Feeding difficulties and foregut dysmotility in Noonan's syndrome* Arch Dis Child 81(1):28–31

Sharland M, Burch M, McKenna WM, Patton MA 1992 *A clinical study of Noonan syndrome* Arch Dis Child 67:178-183

Shaw AC, Kalidas K, Crosby AH, Jeffery S, Patton MA 2006 *The natural history of Noonan Syndrome: a long term follow-up study* Arch Dis Child

Siegel D.H, McKenzie J, Frieden I.J, Rauen K.A 2011 *Dermatological findings in 61 mutation-positive individuals with cardiofaciocutaneous syndrome* British Journal of Dermatology 164: 521-529

Siwik E.S et al 1998 *Cardiac Disease in Costello Syndrome* Pediatrics 101: 706-709

Stein RI, Legault L, Daneman D, Weksberg R, Hamilton J 2004 *Growth hormone deficiency in Costello syndrome* Am J Med Genet A 129A:166–70

Stevenson D, Yang F 2011 *The Musculoskeletal Phenotype of the RASopathies* Am J Med Genet part C 157:90-103

Takahashi K, Kogaki S, Kurotobi S, Nasuno S, Ohta M, Okabe H, Wada K, Sakai N, Taniike M, Ozono K 2005 *A novel mutation in the PTPN11 gene in a patient with Noonan syndrome and rapidly progressive hypertrophic cardiomyopathy* Eur J Pediatr 164:497-500

Takahashi K, Kogaki S, Kuvotobi S, Nasuno S, Ohta M, Okabe H, Wada K, Sakai N, Taniike M, Ozono K 2005 *A novel mutation in the PTPN11 gene in a patient with Noonan syndrome and rapidly progressive cardiomyopathy* Eur J Pediatr 165:497–500

Takai Y et al. 2001 *Small GTP-binding proteins* *Physiol Rev* 81:153-208

Tanaka K, Sato A, Naito T, Kuramochi K, Itabashi H, Takemura Y 1992 *Noonan syndrome presenting growth hormone neurosecretory dysfunction*. *Int Med* 31:908–911

Tanner JM, Davies PS 1985 *Clinical longitudinal standards for height and height velocity for North American children*. *J Pediatr* 107:317–329

Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M 1966 *Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children 1965 Parts I and II*. *Arch Dis Child* 41:454–471

Tartaglia M, Gelb B.D, Zenker M 2011 *Noonan syndrome clinically related disorders* *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(1):161-179

Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, et al 2002 *PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity* *Am J Hum Genet* 70:1555–1563

Tartaglia M, Martinelli S, Stella L et al 2006 *Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease* *American Journal of Human Genetics* 78: 279–290

Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R et al 2001 *Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome* *Nat Genet* 29(4): 465– 468

Tartaglia M, Niemeyer C.M, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, Hählen K, Hasle H, Licht J.D, Gelb B.D 2003 *Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia* Nature Genetics 34:148-150

Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C et al 2007 *Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome* Nature Genetics 39: 75–79

Tartaglia M, Zampino G, Gelb B.D 2010 *Noonan Syndrome: Clinical Aspects and Molecular Pathogenesis* Mol Syndromol 1:2–26

Tosti A et al 1991 *Loose anagen hair in a child with Noonan's syndrome* Dermatologica 182:247-249

Tosti A et al 1997 *Loose anagen hair* Arch Derm 133:1089-1093

Tydiman W.E. et al 2009 *The RASopathies: Developmental syndromes of RAS/MAPK pathway dysregulation* Curr Opin Genet Dev 19(3):230-23

Ucar C, Calyskan U, Martini S, Heinritz W 2007 *Acute myelomonocytic leukemia in a boy with LEOPARD syndrome (PTPN11 gene mutation positive)* J Pediatr Hematol Oncol 28:123-5

Urakami S, Igawa M, Shiina H, Shigeno K, Kikuno N, Yoshino T 2002 *Recurrent transitional cell carcinoma in a child with the Costello syndrome* J Urol 168:1133–1134

van der Burgt I 2007 *Noonan syndrome* Orphanet J Rare Dis 2:4

van der Burgt I, Berends E, Lommen E, van Beersum S, Hamel B, Mariman E 1994 *Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome* Am J Med Genet 53(2):187–191

van der Burgt I, Thoonen G, Roosenboom N et al 1999 *Patterns of cognitive functioning in school-aged children with Noonan syndrome associated with variability in phenotypic expression* J Pediatr 135(6): 707–713

van Eeghen AM, van Gelderen I, Hennekam RCM 1999 *Costello syndrome: Report and review* Am J Med Genet 82:187–193.

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

Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, Tsuneoka M, Komiya S, Baron R, Yoshimura A 2001 *Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signaling* Nature 412:647–51

White SM, Graham JM, Kerr B et al 2005 *The adult phenotype in Costello syndrome* Am J Med Genet A 136:128–35

Witt DR, Mc Gillivray BC, Allanson JE, Heghes HE, Hathaway WE, Zipursky A, Hall JG 1988 *Bleeding diathesis in Noonan syndrome: a common association* Am J genet 31:305-317

Yamamoto GL et al. 2015 J Med Genet 52:413–421

Yoon G, Rosenberg J, Blaser S, Rauen KA 2007 *Neurological complications of cardiofacio-cutaneous syndrome* Dev Med Child Neurol 49:894–9

Young TL, Ziylan S, Schaffer DB 1993 *The ophthalmologic manifestations of the cardio-facio-cutaneous syndrome* J Pediatr Ophthalmol Strabismus 30:48–52

Zampino G, Mastroiacovo P, Ricci R, Zollino M, Segni G et al 1993 *Costello syndrome: further clinical delineation, natural history, genetic definition, and nosology* Am J Med Genet 47: 176–183

Zampino G, Pantaleoni F, Carta C et al 2007 *Diversity, parental germline origin, and phenotypic spectrum of de novo HRAS missense changes in Costello syndrome* Hum Mutat 28(3):265-72

Zeisler EP, W S 1936 *Generalized Lentigo* Arch Dermat Syph 33:109-25

Zenker M 2011 *Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors* Current Opinion in Pediatrics 23:443-4521

Zenker M, Buheitel G, Rauch R, et al 2004 *Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome* J Pediatr 144:368–374