



Espressioni emorragiche ed emostasi nella Sindrome di Noonan

Francesca Marabotto, Mariangela Cisternino, Gabriella Gamba, Laura Losa, Arianna Zaroli

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Espressioni emorragiche ed emostasi nella Sindrome di Noonan

La sindrome di Noonan (SN) è una sindrome a trasmissione autosomica dominante correlata a mutazioni germinali a carico di geni appartenenti al Ras-MAPK *pathway* PTPN11, KRAS, SOS1 e RAF1. Le caratteristiche fenotipiche più importanti sono: *facies* tipica, anomalie cardiovascolari (più frequentemente stenosi della valvola polmonare e cardiomiopatia ipertrofica) e bassa statura. Su una coorte di 19 soggetti (10 M e 9 F, 12 probandi e 7 loro familiari) con SN diagnosticata sulla base dei criteri clinici di Van der Burgt, è stato condotto uno studio sulla coagulazione che comprende la raccolta di anamnesi per diatesi emorragica ed i dosaggi di PTT, Fattore VIII, vWF_{Ag}, vWFRicof; infine è stato effettuato lo studio della funzionalità piastrinica. Sono state poste in relazione le alterazioni riscontrate con il genotipo dei pazienti e ancora messe a confronto le anomalie ematologiche con l'età dei soggetti e la presenza o meno di cardiopatia. I risultati di questo studio hanno evidenziato un'anamnesi positiva per diatesi emorragica nel 47% dei casi e la presenza di alterazioni ai test di screening emorragico nel 26%, di alterazioni dei fattori della coagulazione nel 47% e di alterazioni dell'aggregazione piastrinica ancora nel 44% dei casi; tali alterazioni sono presenti sia nei portatori di mutazioni genetiche che nei soggetti negativi per mutazioni; inoltre la molteplicità dei difetti riscontrati, che non sembrano essere correlati tra loro, e la variabilità della loro espressione non possono essere riconducibili al difetto di un singolo gene. Si è osservato inoltre che le alterazioni delle prove della coagulazione sono presenti in tutti i casi con anamnesi positiva per diatesi emorragica, mentre il 60 % dei casi con anamnesi negativa ha presentato una qualche alterazione ai test di laboratorio. È emersa una significativa differenza del quadro ematologico tra i probandi (la maggior parte dei quali presenta alterazioni) e i loro familiari affetti da SN (non interessati da tali deficit, ma con una storia anamnestica di diatesi emorragica): tale osservazione potrebbe sostenere l'ipotesi di van der Burgt che alcune alterazioni, tra cui i difetti della coagulazione, della SN tendono a scomparire con l'età. Nella casistica di questo studio le anomalie della coagulazione sono risultate significativamente più frequenti nei soggetti con cardiopatia; al contrario tali alterazioni non sono presenti nei soggetti senza cardiopatia, i quali tuttavia, pur non avendo mostrato alterazioni della coagulazione, hanno un'anamnesi positiva per diatesi emorragica. Questo dato potrebbe indicare che la cardiopatia non è sempre e solo l'unica responsabile delle anomalie della coagulazione nella SN. Per concludere, nonostante la complessità e la vasta eterogeneità dei difetti della coagulazione, a cui si aggiunge spesso la mancata correlazione tra dato clinico e dati di laboratorio, è raccomandabile effettuare sempre un esteso *work up* ematologico nei pazienti con SN, per il rischio che questi, qualora sottoposti a procedure chirurgiche, vadano incontro a sanguinamenti peri-operatori non previsti.

Bleeding diathesis in Noonan Syndrome

Noonan syndrome (NS) is a congenital disorder, inherited as an autosomal dominant trait, characterized by dysmorphic *facies*, congenital heart defects, short stature and other anomalies including coagulation abnormalities not fully studied so far. The aim of this study was to evaluate phenotypic characteristics, gene mutations, and coagulation parameters in 19 clinically diagnosed cases of NS (10 M, 9 F, 12 probands and 7 first degree relatives), 16 were mutation-positive: PTPN11 (n.7), SOS1 (n.8) and SOS1/RAF1 (n.1), and the remaining 3 were mutation-negative. A positive history for abnormal bleeding was found in 9 patients (47%), a prolonged PTT in 5 individuals (26%), coagulation factors deficiency in 9 patients (47%) and abnormal platelet aggregation in 8 patients (44%); the coagulation abnormalities were found either in the 9 patients with a history of abnormal bleeding either in 6 cases (60%) without clinical evidence of bleeding disorders. The coagulation abnormalities were reported both in patients carrying mutations in NS specific genes and in those mutations-negative and were not correlated with a mutation of a specific gene. Important differences in haemostatic status were found between probands and their relatives as the former showed coagulation abnormalities in the majority of the cases while the latter showed a history of bleeding diathesis, but normal laboratory hematological screen. The coagulation abnormalities were more frequent in patients with heart defects; however, a history of bleeding diathesis was detected in patients without cardiopathy. In conclusion, a high frequency of coagulation abnormalities has been found in NS. These abnormalities do not seem to be related with the patients genotype, considering the multiplicity of the unrelated types of bleeding abnormalities and the variability of their expression. The heart defects should not to be the only cause of the haemostatic disorders. The bleeding disorders, as well other phenotypic NS features, tend to decrease with age. Our advice is to screen every patients with NS for a bleeding diathesis to avoid bleedings and post-operative complications.

Introduzione

La SN è stata descritta per la prima volta nel 1963 da J. Noonan, una cardiologa pediatra del Kentucky, che riportò in letteratura 9 casi con stenosi della valvola polmonare, *facies* sindromica e bassa statura. La SN presentava alcune caratteristiche cliniche in comune con la sindrome di Turner (bassa statura e pterigio) ed interessava sia pazienti di sesso femminile che maschile [1]. La SN è una patologia a trasmissione autosomica dominante, a penetranza completa ed espressività variabile. Tuttavia, molti casi sono sporadici e vi è evidenza anche di trasmissione autosomica recessiva. Essa è caratterizzata da:

- bassa statura armonica;
- *facies* tipica;
- malformazioni cardiache congenite, più frequentemente stenosi della valvola polmonare (SVP) e cardiomiopatia ipertrofica (CMI);
- deformità scheletriche del petto (petto carenato/escavato);
- criptorchidismo nel maschio;
- pubertà ritardata.

L'incidenza della malattia varia da 1:1000 a 1:2500 [2]. L'età media alla diagnosi è di 9 anni. L'aspettativa di vita è verosimilmente normale in assenza di grave malformazione cardiaca. Generalmente si pone il sospetto diagnostico di SN in presenza della *facies* o delle tipiche malformazioni cardiache. Nei neonati la *facies* può essere meno evidente, ma l'edema generalizzato, i difetti cardiaci congeniti e l'eccesso di pliche nicali possono orientare verso tale diagnosi. La diagnosi di SN è principalmente clinica e viene posta sulla base dei criteri di Van der Burgt (Tabella 1) [3]. Ad oggi, questi criteri sono quelli più diffusamente impiegati e permettono di selezionare i pazienti da sottoporre ad analisi genetica allo scopo di individuare le eventuali mutazioni genetiche. Secondo il modello presentato da Van der Burgt, per poter porre diagnosi di SN devono essere presenti:

- *facies* tipica associata ad almeno un criterio maggiore o due minori, oppure
- *facies* suggestiva associata ad almeno due criteri maggiori o tre minori.

L'analisi delle caratteristiche cliniche dei pazienti con SN, con diagnosi confermata da studi molecolari, ha dimostrato che nessuna di queste da sola può portare ad una diagnosi certa di SN; al contrario, i criteri di Van der Burgt, che prendono in considerazione la *facies*, la statura, le deformità toraciche e i difetti cardiaci, si sono dimostrati uno strumento preciso ai fini diagnostici. Recentemente, a partire dal 2001, sono state identificate mutazioni genetiche a carico di alcuni geni del *Ras-MAPK pathway* (PTPN11, SOS1, KRAS e RAF1) che sono presenti in circa la metà dei soggetti affetti da SN. La diagnosi di SN può, inoltre, essere sospettata in epoca prenatale per il riscontro di igroma cistico a livello della colonna spinale cervicale o di translucenza nucale all'ecografia fetale. Questi reperti, comuni ad altri quadri sindromici quali la sindrome di Turner e la sindrome di Down, rendono necessarie ulteriori indagini quali la villocentesi e l'amniocentesi per la ricerca di anomalie cromosomiche. Tuttavia, poiché in assenza di anomalie cromosomiche, la diagnosi di SN viene posta solo nel 2% circa dei casi con edema nucale, la ricerca di mutazioni di PTPN11 di routine non è indicata a meno che non siano riscontrate caratteristiche cliniche aggiuntive. Inoltre, poiché la lunghezza alla nascita e il peso sono generalmente normali nella SN, i parametri della crescita fetale non sono di aiuto nella diagnosi [4].

Scopo del lavoro

La Sindrome di Noonan è una condizione congenita a trasmissione autosomica dominante, penetranza incompleta ed espressività variabile, talvolta ad insorgenza sporadica. I soggetti affetti presentano caratteristiche fenotipiche peculiari e molteplici anomalie congenite, ampiamente descritte in letteratura. Meno studiata è l'associazione tra la Sindrome di Noonan e la diatesi emorragica. Vi sono pochi lavori in letteratura su questa associazione e la maggior parte di questi sono antecedenti alla identificazione dei geni responsabili della SN [5]. Tuttavia le anomalie della coagulazione sono considerate far parte della SN e, quando presenti, suggestive per la sua diagnosi [6]. Sono stati fin'ora riportati difetti dei fattori della coagulazione, in particolare dell'XI che è stato il più indagato, ma sono state citate anche specifiche anomalie della via intrinseca, in particolare dei fattori VIII, IX, XI, XII, XIII e la malattia di Von Willebrand [7-8-9]. In altri casi invece la tendenza al sanguinamento è stata attribuita alla trombocitopenia e/o ad un difetto della funzionalità piastrinica [10-11].

Lo scopo di questo studio è stato innanzitutto quello di ricercare una diatesi emorragica ed eventuali alterazioni dell'emostasi in una coorte di pazienti con diagnosi di SN e di porre in relazione le eventuali alterazioni con il genotipo dei pazienti, al fine di individuare una possibile influenza dei geni PTPN11, SOS1, RAF1 sul controllo della cascata coagulativa. Infine si è ricercata una possibile correlazione tra le anomalie ematologiche e l'età dei soggetti e la presenza o meno di cardiopatia.

Materiali e metodi

In questo studio sono stati valutati 19 pazienti (10 maschi e 9 femmine) affetti da Sindrome di Noonan, seguiti presso il dipartimento di Scienze Pediatriche dell'Università degli Studi di Pavia. Di questi 19, 12 sono probandi (di cui 5 casi familiari e 7 sporadici); i rimanenti 7 sono parenti di primo grado, per un totale di quattro famiglie esaminate (figure 1-2-3-4); i restanti 7/19 casi sono sporadici. L'analisi genetica ha dimostrato che:

- 7 pazienti, tra cui 5 probandi e 2 madri, sono positivi per mutazioni del gene PTPN11.
- 9 presentano positività per mutazioni del gene SOS1 (4 probandi e 5 familiari), in particolare un probando presenta doppia positività per SOS1 e RAF1 e i suoi familiari tra cui il padre e il nonno positività solo per SOS1; nella seconda famiglia invece la madre, lo zio e il nonno materno e la paziente stessa sono tutti SOS1 positivi.
- Nella seconda famiglia invece la madre, lo zio, il nonno materno e la paziente stessa sono tutti SOS1 positivi.
- 3 probandi sono negativi per mutazioni genetiche, ma presentano il fenotipo Noonan in accordo con i criteri di Van der Burgt [3].

L'età cronologica al momento dell'osservazione è compresa, per i probandi, tra i 4.5 e i 17 anni e, per i familiari, tra i 38 e i 86 anni. In tutti i casi è stata effettuata una valutazione della diatesi emorragica attraverso un apposito questionario suddiviso in base all'età; per i pazienti maggiori di 18 anni il suddetto è caratterizzato dai seguenti punti:

- sanguinamento cutaneo;
- sanguinamento da piccole ferite;
- epistassi;
- gengivorragie;
- sanguinamento del tratto gastrointestinale;
- sanguinamento prolungato dopo estrazione dentale;
- sanguinamento prolungato dopo intervento chirurgico;
- menorragia;
- sanguinamento *post-partum*;
- ematoma muscolare;
- emartro;
- sanguinamento a livello del sistema nervoso centrale.

Per i candidati minori di 18 anni invece il questionario comprende l'anamnesi familiare (che indaga sui problemi emorragici dopo interventi chirurgici, estrazioni dentarie o dopo il parto, difetti congeniti della coagulazione, piastrinopenia o piastrinopatia) e quella personale che considera, oltre alle manifestazioni emorragiche già citate per l'adulto, anche il sanguinamento dopo caduta del cordone ombelicale e le dimensioni, la sede e la frequenza della comparsa di ecchimosi. Inoltre è stata ricercata la presenza di fattori di rischio trombotico (per i soggetti adulti o per quelli a rischio) ed anche segnalata l'eventuale assunzione di farmaci (pillola estroprogestinica, antiaggreganti, etc.) in grado di influenzare le analisi di laboratorio. Successivamente a tutti i pazienti è stato fatto un prelievo di sangue venoso per eseguire le seguenti analisi: test di screening per la diatesi emorragica, che comprendono i seguenti parametri: Tempo di Tromboplastina Parziale (PTT), Attività del Complesso Protrombinico (ACP), *International Normalised Ratio* (INR). Dosaggio dei fattori della coagulazione, in particolare: Fattore VIII, vWF_{Ag}, vWFRicof, Fibrinogeno. Inoltre nei casi che presentavano un allungamento del PTT sono stati dosati anche i fattori IX e XI. Tutte le analisi sopraelencate sono state effettuate presso il Laboratorio Centrale della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Infine tutti i soggetti partecipanti allo studio hanno effettuato l'emocromo per il conteggio e il volume piastrinico e 18 pazienti su 19 anche uno studio della funzionalità piastrinica mediante PFA-100. PFA-100 è un sistema composto da uno strumento e da apposite cartucce, nel quale il processo di adesione e di aggregazione piastrinica, conseguente ad un danno vascolare, viene simulato *in-vitro*. Il sistema PFA-100 permette una valutazione rapida della funzionalità piastrinica su piccoli campioni di sangue intero addizionato

di anticoagulante in base al principio descritto da Kratzer e Born. Lo strumento PFA-100 determina il tempo dall'inizio del test fino ad occlusione dell'apertura da parte delle piastrine e riporta tale intervallo di tempo come Tempo di Chiusura (TC). Il TC è un indice della funzionalità piastrinica nel campione di sangue intero in esame. La cartuccia Collagene/Epinefrina (Col/EPI) è la cartuccia primaria utilizzata per rilevare le disfunzioni piastriniche indotte da difetti intrinseci delle piastrine, dalla malattia di Von Willebrand o da esposizione ad inibitori piastrinici. La cartuccia Collagene/ADP (Col/ADP) viene utilizzata per verificare se un risultato anormale ottenuto con la cartuccia Col/EPI possa essere stato causato dall'effetto di ASA o da farmaci contenenti ASA. I soggetti reclutati sono stati sottoposti in precedenza ad un accurata valutazione clinico-laboratoristica che comprende principalmente lo studio cardiologico e lo studio genetico per la determinazioni delle mutazioni tipiche della SN. La valutazione clinica è stata finalizzata alla ricerca dei criteri maggiori e minori secondo Van der Burgt [3], utilizzati per la diagnosi clinica di SN; in relazione al fenotipo presentato, casi selezionati hanno eseguito consulenze multidisciplinari in merito alle condizioni patologiche comprese nel quadro della SN (valutazione cardiologica, dermatologica, dell'età ossea, neuropsichiatrica, oftalmologica, otorinolaringoiatria e ortopedica). I parametri auxologici e dello sviluppo puberale, valutati nei probandi, sono stati confrontati con gli standard di normalità di Tanner. Per la lettura dell'età ossea è stato utilizzato l'atlante di Greulich e Pyle. Per la diagnosi di cardiopatia sono stati impiegati i criteri ecocardiografici classici. L'ipertrofia del ventricolo sinistro è stata esaminata a fine diastole in *short-axis* a livello della valvola mitrale e del muscolo papillare. Il movimento sistolico anteriore della mitrale è stato valutato con l'*M-mode*. Il gradiente di efflusso del ventricolo sinistro è stato determinato con la proiezione apicale delle 5 camere e con la parasternale usando il Doppler pulsato e continuo. La valvola polmonare è stata studiata usando l'ecocardiografia bidimensionale. La displasia della valvola polmonare è stata diagnosticata quando il diametro della valvola polmonare risultava minore del valore medio e vi era un'asimmetria dello spessore delle cuspidi con movimento limitato delle cuspidi stesse. Lo studio della valvola polmonare è stato effettuato mediante la parasternale *short-axis* usando il doppler a colori pulsato e continuo. L'efflusso del ventricolo destro prima della valvola polmonare è stato valutato con il Doppler per determinare un'eventuale stenosi sottovalvolare significativa. Il rigurgito della valvola polmonare è stato determinato secondo le metodiche standard. Una velocità Doppler elevata sulla valvola polmonare è stata definita come una velocità $>2DS$ dal valore medio della popolazione normale. Una stenosi polmonare significativa è definita come una velocità al Doppler $>300\text{cm/sec}$. La diagnosi di CMI è stata posta sulla base di uno spessore massimo della parete ventricolare sinistra a fine diastole maggiore di $2DS$ rispetto alla media per l'età. Previo consenso informato del genitore o del paziente, se maggiorenne, è stato eseguito prelievo di sangue periferico per l'analisi genetica, eseguita presso i laboratori del Dipartimento di Genetica dell'Università degli Studi di Milano. Nei casi risultati positivi per la mutazione l'analisi è stata estesa al nucleo familiare. Il DNA da sequenziare è stato estratto dai linfociti del sangue periferico dei pazienti seguendo una procedura standard, che prevede una prima incubazione con buffer di lisi a base di triton ed una seconda incubazione con proteinasi K. È stata, poi, eseguita l'amplificazione mediante PCR ed il sequenziamento. Il gene è stato, quindi, amplificato con *primer* specifici in frammenti che sono stati sequenziati attraverso l'allestimento di una reazione di polimerizzazione secondo la procedura prevista per il kit Big Dye Terminator ABI Prism (Applied Biosystem) e sottoposti ad elettroforesi capillare, utilizzando il sequenziatore automatico ABI Prism 3100. I dati sono stati infine elaborati da un *software* dedicato che fornisce un *output* in termini di picchi colorati corrispondenti alle 4 basi del DNA in sequenza che costituiscono l'elettroferogramma. I dati riguardanti i pazienti sono stati caricati su un programma di archiviazione e successivamente la loro elaborazione è stata effettuata con l'ausilio di un programma di statistica (pacchetto MedCalc versione 9.5).

È stato testato il *Chi-Square* per studiare l'ipotesi nulla secondo cui le variabili prese in esame (risposta positiva o negativa) e l'età dei pazienti (probandi e familiari) o il grado di cardiopatia siano indipendenti, cioè tali che tutte le categorie (positivo o negativo) delle variabili abbiano la stessa frequenza al variare dell'età dei pazienti (probandi o familiari) o del grado di cardiopatia. Sono stati considerati significativi i valori di $p < 0.05$.

Risultati

I probandi e i familiari arruolati nello studio presentano le caratteristiche fenotipiche e le anomalie congenite elencate in tabella 2. I risultati di questo studio sono illustrati nelle tabelle 3-8. L'anamnesi di diatesi emorragica è risultata positiva in 9 dei 19 pazienti esaminati (47%), 6 probandi e 3 familiari adulti; questi 9 pazienti hanno riferito una tendenza al sanguinamento caratterizzata da: facilità alle ecchimosi, epistassi, prolungato sanguinamento da taglio o estrazioni dentarie e, negli adulti, emorragie dopo interventi chirurgici e menometrorragie. Di questi 9 soggetti 4 sono positivi per la mutazione del gene PTPN11, che sul totale di 7 pazienti PTPN11+ corrispondono alla percentuale del 57%. Questa maggior tendenza al sanguinamento è inoltre presente in 3/8 soggetti (37%) SOS1+, nell'unico caso di positività per doppia mutazione SOS1/RAF1 e in 1/3 (33%) dei soggetti negativi per mutazioni a carico dei geni esaminati (Tabella 3).

Test di screening e fattori della coagulazione: si può osservare che i valori principalmente alterati all'interno della coorte dei 19 pazienti presi in esame sono il PTT, il Fattore VIII, vWF_{Ag}, vWFRicof, mentre l'ACP, l'INR e il Fibrinogeno sono risultati nella norma (Tabella 4). Relativamente al PTT si può osservare che esso è allungato complessivamente in 5/19 pazienti (26%), di cui 1/7 (14%) PTPN11+, 2/8 (25%) SOS1+ e 2/3 (67%) dei pazienti con genetica negativa; l'unico soggetto con doppia mutazione SOS1/RAF1 invece non ha mostrato alterazioni. Il Fattore VIII è ridotto in 9/19 pazienti (47%): in particolare 4/7 (57%) positivi per PTPN11, 2/8 (36%) positivi per SOS1, il singolo paziente con doppia mutazione SOS1/RAF1 e infine 2/3 (67%) dei soggetti negativi per le mutazioni genetiche considerate in questo studio. Per quanto riguarda il vWF_{Ag} si evidenzia invece che 2/19 pazienti (11%) hanno mostrato una riduzione di tale valore al di sotto dei limiti della normalità, di cui 1/7 (14%) PTPN11 positivi e 1/8 (12%) SOS1 positivi, mentre nel paziente SOS1/RAF1 positivo e nei 3 soggetti negativi per mutazioni dei geni coinvolti nella SN non vi sono alterazioni. I valori di vWFRicof infine sono risultati alterati in 6/19 pazienti (32%), di cui 3/7 (43%) PTPN11+, 2/8 (25%) SOS1+ e da ultimo il soggetto SOS1/RAF1+. I pazienti con genetica negativa non hanno manifestato variazioni patologiche. Infine nei 7 casi su 19 in cui è stato dosato il fattore XI, solo un soggetto ha mostrato riduzione di tale valore.

Studio della funzionalità piastrinica: è stato eseguito in 18 su 19 partecipanti allo studio per valutare la capacità delle piastrine, presenti in numero adeguato in tutti i pazienti, di promuovere una valida emostasi primaria. In un paziente adulto SOS1+ non è stato possibile eseguire questo tipo di esame per assunzione ticlopidina in grado di influenzare i valori dell'aggregabilità piastrinica. I risultati sono illustrati in tabella 5. Un allungamento del tempo di chiusura funzionale piastrinico al PFA-100 con Collagene/Epinefrina è stato osservato in 8/18 pazienti (44%): 3/7 (43%) PTPN11+, 3/7 (43%) SOS1+, 1/3 (33%) negativi per mutazioni genetiche ed infine il paziente SOS1/RAF1+; invece il tempo di chiusura al PFA-100 con Collagene/ADP è risultato allungato in 5/18 pazienti (28%): 2/7 (29%) PTPN11+, 1/7 (14%) SOS1+, 1/3 (33%) negativi per mutazioni e da ultimo nel paziente con doppia mutazione SOS1/RAF1. Non vi è differenza significativa delle alterazioni della funzionalità piastrinica tra i soggetti con genetica positiva e quelli con genetica negativa.

Dall'analisi di questi dati appare che le alterazioni sono ugualmente presenti sia nei soggetti PTPN11+, SOS1+, SOS1/RAF1+, sia nei soggetti negativi per le mutazioni genetiche. Come riportato in tabella 6, dei 9 soggetti con anamnesi positiva per diatesi emorragica, 7 hanno presentato alterazioni ai test di laboratorio: si tratta di 6 probandi e 1 familiare; nei rimanenti 2 i test non sono valutabili per l'assunzione di pillola estroprogestinica in un caso e di antiaggreganti nell'altro caso. Al contrario 6 su 10 pazienti con anamnesi muta per diatesi emorragica non mostrano alcuna alterazione dei test laboratoristici (60%), mentre i rimanenti 4 hanno presentato alterazioni ai test di laboratorio.

Ponendo a confronto i dati ottenuti dei probandi con quelli dei familiari, si è osservato che le alterazioni ai test di screening emorragico sono presenti in 5/12 (42%) probandi e in 0/7 familiari, le alterazioni dei fattori della coagulazione in 9/12 (75%) probandi e in 0/7 familiari (questa differenza tra i due gruppi di soggetti è statisticamente significativa), mentre l'allungamento del tempo di chiusura al PFA-100 è presente in 7/12 (58%) probandi e 1/6 (17%) familiari (Tabella 7).

Si è cercato inoltre di valutare una possibile correlazione tra la presenza di cardiopatia e la gravità di quest'ultima con le alterazioni ematologiche. Per tale motivo è stata assegnata una scala di gravità della cardiopatia così suddivisa: lo 0 corrisponde all'assenza di difetti cardiaci, l'1, il 2 e il 3 alla presenza rispettivamente di cardiopatia di entità lieve, moderata e grave (Tabella 8). Vi è un incremento progressivo e statisticamente significativo della prevalenza delle alterazioni dei fattori della coagulazione e della funzionalità piastrinica con l'aggravarsi dell'anomalia cardiaca, mentre la positività anamnesticca di diatesi emorragica è ugualmente presente in tutti i casi, compresi quelli senza cardiopatia. Infine nella paziente affetta da grave stenosi polmonare si è evidenziata anamnesi positiva per diatesi emorragica e riduzione dei fattori della coagulazione. Lo studio funzionale piastrinico, effettuato per motivi tecnici dopo l'intervento chirurgico di valvulotomia, è risultato normale. Tre pazienti infine presentano una associazione di due difetti, la riduzione del fattore di von Willebrand e l'allungamento del tempo di chiusura allo studio funzionale piastrinico, mentre nei casi rimanenti tali difetti sono separati.

Discussione

La SN è una tra le sindromi più frequenti, con un'incidenza stimata intorno ad un caso su 1000-2500 nuovi nati. Questa sindrome ha un'ampia variabilità fenotipica poichè è caratterizzata da un ampio spettro di manifestazioni cliniche che possono essere di varia gravità. I difetti della coagulazione, che spesso fanno parte del quadro clinico tanto da essere considerati fortemente indicativi della malattia (Sharland 1990), sono anch'essi molteplici. Un'anamnesi di diatesi emorragica è spesso presente nei soggetti con SN, con una prevalenza che è compresa tra il 30% ed il 50% dei casi (Sharland, Lancet 1992, Bertola, Rev Hosp 2003). Sono stati inoltre descritti piastrinopenie, difetti funzionali piastrinici e deficit di uno o più fattori della coagulazione [7-11]. I risultati di questo studio hanno evidenziato la presenza di una storia clinica di diatesi emorragica nel 47% dei casi e la presenza di alterazioni ai test di screening emorragico nel 26%, di alterazioni dei fattori della coagulazione nel 47% e di alterazioni dell'aggregazione piastrinica ancora nel 44% dei casi. Si è osservato inoltre che le alterazioni delle prove della coagulazione sono presenti in tutti i casi con anamnesi positiva per diatesi emorragica tranne in due in cui non è stato possibile valutare questa associazione perché sottoposti a terapie che possono interferire con la risposta ai test. D'altra parte il 60% dei casi con anamnesi negativa per diatesi emorragica ha presentato una qualche alterazione ai test di laboratorio. Questo suggerisce di effettuare lo screening per malattie emorragiche ai casi con SN anche di fronte ad un'anamnesi muta. I soggetti con SN sono spesso sottoposti a procedure chirurgiche specie interventi cardiocirurgici e di orchidopessi. È necessaria quindi un'attenta valutazione della coagulazione per il rischio che possano

presentare gravi emorragie perioperatorie. La maggior parte degli studi sulle anomalie della coagulazione nella SN sono stati condotti in passato e sono antecedenti alla scoperta dei geni responsabili della SN. Come è noto infatti il primo gene individuato è stato il PTPN11 nel 2001, poi il gene KRAS nel 2006 ed infine i geni SOS1, RAF1 e MEK nel 2007 e non vi sono ancora in letteratura studi di correlazione tra il genotipo e i difetti dell'emostasi. Questo è il primo studio che ha correlato le anomalie della coagulazione con le alterazioni genetiche presenti o meno nella SN. In particolare si è evidenziato che la diatesi emorragica, presente nel 47% dei casi, è presente sia nei portatori di mutazioni genetiche a carico di PTPN11, SOS1 e RAF1 che nei soggetti negativi per mutazioni. Anche le alterazioni delle prove di coagulazione che, come detto, sono state riscontrate nel 26% dei casi, interessano sia i soggetti positivi che negativi per le suddette mutazioni geniche. Quindi nessuno dei tre geni mutati appare di per sé responsabile dei difetti della coagulazione. D'altra parte la molteplicità dei difetti riscontrati, che non sembrano essere correlati tra loro, e la variabilità della loro espressione non possono essere riconducibili al difetto di un singolo gene. Poiché come è noto i geni individuati nella SN fanno parte del *Ras-Pathway*, deputato alla sintesi dei fattori di trascrizione a livello della membrana cellulare del recettore, si può ipotizzare che i geni PTPN11, SOS1 e RAF1 influenzino l'espressione di quei geni implicati direttamente nella regolazione della cascata coagulativa. Un dato di grande interesse emerso da questo studio è la differenza del quadro ematologico nei probandi e nei loro familiari sempre affetti da SN. In tutti i familiari tranne uno non sono emersi difetti della coagulazione, pur avendo alcuni di essi un'anamnesi positiva per diatesi emorragica; d'altra parte la maggior parte di essi non presenta nemmeno un fenotipo tipico di SN pur essendo portatori di mutazione genetica. Solo una madre PTPN11 positiva ha mostrato un difetto funzionale piastrinico con allungamento del tempo di chiusura ed inoltre presenta un'insufficienza aortica di grado moderato. Questa osservazione potrebbe sostenere l'ipotesi di van der Burgt (van der Burgt 2007) che alcune alterazioni, tra cui i difetti della coagulazione, della SN tendono a scomparire con l'età. A rafforzare questa ipotesi vi è l'osservazione nella casistica di questo studio che alcuni familiari, pur non presentando alterazioni ai test di Laboratorio, hanno storia anamnestica di diatesi emorragica. Una possibile origine dei difetti dell'emostasi nella SN potrebbe essere la cardiopatia. Alcuni studi condotti su bambini portatori di cardiopatie non affetti da SN hanno evidenziato anomalie della coagulazione che sarebbero secondarie alla cardiopatia cianogena (Osthaus, Blood Coagul Fibrinolysis 2008). Studi sperimentali su cani affetti da stenosi aortica di grado severo hanno evidenziato deficit combinato di fattore von Willebrand e di adesività piastrinica che sarebbero secondari alla turbolenza del flusso ematico attraverso la stenosi (Tarnow, J Vet Intern Med 2005). In pratica, a causa dello stress indotto dal flusso turbolento, i multimeri del vWF sono resi più suscettibili al clivaggio da parte di una metalloproteasi plasmatica ADAMTS 13, con conseguente perdita di funzione; viene meno in pratica la loro azione di mediatori dell'adesione piastrinica al collagene sottoendoteliale in seguito ad un danno vascolare, per cui viene alterato il meccanismo dell'emostasi primaria. L'associazione di un deficit acquisito del fattore von Willebrand tipo 2° e dell'aggregabilità piastrinica è stata inoltre riportata nel 20% di soggetti affetti da stenosi aortica (Vincentelli NEJM 2003, Panzer 2010). In accordo con queste osservazioni, nella casistica di questo studio le anomalie della coagulazione sono risultate significativamente più frequenti nei soggetti con cardiopatia; 3 soggetti inoltre con cardiopatia di grado moderato hanno mostrato l'associazione di deficit del fattore von Willebrand e difetto di adesività piastrinica. Queste alterazioni non sono presenti nei soggetti senza cardiopatia, i quali tuttavia, pur non avendo mostrato alterazioni della coagulazione, hanno un'anamnesi positiva per diatesi emorragica. Questo dato potrebbe indicare che la cardiopatia non è sempre e solo l'unica responsabile delle anomalie della coagulazione nella SN.

Per concludere, nonostante la complessità e la vasta eterogeneità dei difetti della coagulazione, a cui si aggiunge spesso la mancata correlazione tra dato clinico e dati di laboratorio, è raccomandabile effettuare sempre un esteso *work up* ematologico nei pazienti con SN, per il rischio che questi pazienti, qualora sottoposti a procedure chirurgiche, vadano incontro a sanguinamenti peri-operatori non previsti.

Tabelle e figure

Tabella 1. Criteri clinici per la diagnosi di SN in accordo con Van der Burgt.

Criteri	Maggiori	Minori
<i>Facies</i>	Tipica	Suggestiva
<i>Difetti cardiaci</i>	SVP e/o ECG tipico	Altri difetti
<i>Statura</i>	<3° centile	<10° centile
<i>Deformità toraciche</i>	Petto carenato/escavato	Torace largo
<i>Storia familiare</i>	Parente di primo grado con SN	Parente di primo grado con sospetta SN
<i>Altri</i>	Tutti e tre (nel sesso maschile): - ritardo mentale - criptorchidismo - displasia linfatica	Uno tra: - ritardo mentale - criptorchidismo - displasia linfatica

Tabella 2. Caratteristiche fenotipiche a confronto nei probandi e nei familiari.

Caratteristiche fenotipiche	Probandi	Familiari	Totale
<i>Facies</i>	12/12 (100%)	6/7 (86%)	18/19 (95%)
<i>Anomalie ectodermiche</i>	6/12 (50%)	0/1 (0%)	6/13 (46%)
<i>Deformità toraciche</i>	9/12 (75%)	2/3 (67%)	11/15 (73%)
<i>Ritardo mentale</i>	3/11 (27%)	1/3 (33%)	4/14 (29%)
<i>Criptorchidismo</i>	2/6 (33%)	1/4 (25%)	3/10 (30%)
<i>Ritardo puberale</i>	2/3 (67%)	5/7 (71%)	7/10 (70%)
<i>Altezza < 3° centile</i>	6/12 (50%)	2/7 (29%)	8/19 (42%)
<i>Altezza < 10° centile</i>	9/12 (75%)	3/7 (43%)	12/19 (63%)
<i>Terapia con GH</i>	4/12 (33%)	2/7 (29%)	6/19 (32%)
<i>Cardiopatìa</i>	12/12 (100%)	1/7 (14%)	13/19 (68%)
<i>Diatesi emorragica</i>	6/12 (50%)	3/7 (43%)	9/19 (47%)

Tabella 3. Correlazione tra le mutazioni genetiche e l'anamnesi positiva per diatesi emorragica.

	PTPN11 (N7)	SOS1 (N 8)	SOS1+RAF1 (N 1)	Negativi (N 3)	Totale (N 19)
<i>Anamnesi positiva per diatesi emorragica</i>	4/7 (57%)	3/8 (37%)	1/1 (100%)	1/3 (33%)	9/19 (47%)

Tabella 4. Screening emorragico e fattori della coagulazione in relazione alle mutazioni genetiche nei pazienti con SN.

Alterazioni di laboratorio	PTPN11 (N 7)	SOS1 (N 8)	SOS1+RAF1 (N 1)	Negativi (N 3)	Totale (N 19)
<i>PTT</i>	1/7 (14%)	2/8 (25%)	0/1 (0%)	2/3 (67%)	5/19 (26%)
<i>FVIII C</i>	4/7 (57%)	2/8 (25%)	1/1 (100%)	2/3 (67%)	9/19 (47%)
<i>vWFAg</i>	1/7 (14%)	1/8 (12%)	0/1 (0%)	0/3 (0%)	2/19 (11%)
<i>vWFRicof</i>	3/7 (43%)	2/8 (25%)	1/1 (100%)	0/3 (0%)	6/19 (32%)

Tabella 5. Studio funzionale piastrinico in rapporto alle mutazioni genetiche dei pazienti.

	PTPN11 (N 7)	SOS1 (N 7)	SOS1+RAF1 (N 1)	Negativi (N 3)	Totale (N 19)
<i>Allungamento del tempo di chiusura (PFA-100 con Coll-Epi)</i>	3/7 (43%)	3/7 (43%)	1/1 (100%)	1/3 (33%)	8/18 (44%)
<i>Allungamento del tempo di chiusura (PFA-100 con Coll-ADP)</i>	2/7 (29%)	1/7 (14%)	1/1 (100%)	1/3 (33%)	5/18 (28%)

N.B. Non è stato possibile effettuare lo studio funzionale piastrinico su un paziente per recenti assunzioni di farmaci.

Tabella 6. Diatesi emorragica e presenza di alterazioni di laboratorio.

Diatesi emorragica	Alterazioni			Nessuna alterazione
	test di screening emorragico	fattori della coagulazione	studio funzionale piastrinico	
<i>Anamnesi positiva (N 9)</i>	4/9 (44%)	6/9 (67%)	5/9 (56%)	2*/9 (22%)
<i>Anamnesi negativa (N 10)</i>	1/10 (10%)	3/10 (30%)	3/9 (33%)	6/10 (60%)

*una paziente assume pillola estroprogestinica e l'altro farmaci antiaggreganti etc.

Tabella 7. Presenza di alterazioni di laboratorio nei probandi e nei familiari affetti da SN.

Alterazioni	Probandi (N 12)	Familiari (N 7)	Totale (N 19)	P-value
<i>test di screening emorragico</i>	5*/12 (42%)	0/7 (0%)	5/19 (26%)	0.1472
<i>fattori della coagulazione</i>	9**/12 (75%)	0/7 (0%)	9/19 (47%)	0.0073
<i>studio funzionale piastrinico</i>	7***/12 (58%)	1/6 (17%)	8/18 (44%)	0.1784

*di cui 2 pz hanno alterazioni del PTT , 2 alterazioni di PTT e INR e 1 anche dell'ACP
 **di cui 4 hanno alterazioni del fVIII C, 2 di fVIII C/vWAg/vWFRicof e un altro di fVIII C/vWFRicof
 ***di cui 1 solo con PFA-100 con Col/Epi e 2 con entrambi gli studi

Tabella 8. Correlazione tra le alterazioni dell'emostasi e l'entità della cardiopatia.

Cardiopatia (grado)	Anamnesi positiva	Alterazioni ai test di screening emorragico	Alterazioni dei fattori della coagulazione	Alterazioni allo studio funzionale piastrinico	2 o più alterazioni di laboratorio
0 (N 6)	3*/6 (50%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	1/5 (20%)	0/6 (0%)
1 (N 6)	2/6 (33%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	2/6 (33%)	4/6 (67%)
2 (N 5)	3/5 (60%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)
3 (N 1)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)
p-value	0.6005	0.2086	0.0237	0.0361	0.0147
*2/3 in trattamento con pillola estroprogestinica, 1/3 in terapia con antiaggreganti, anticoagulanti e antipertensivi					

Bibliografia

1. Mendez HMM, Opitz JM, Reynolds JF. Noonan syndrome, a review. *Am J Med Genet* 1985;21:493-506.
2. Sharland M, Burch M, McKenna WM et al. A clinical study of Noonan syndrome. *Arch Dis Child* 1992;67:178-183.
3. Van der Burgt I, Berends E, Lommen E et al. Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 1994;53:187-191.
4. Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genom Human Genet* 2005;6:45-68.
5. Witt DR, McGillivray BC, Allanson JE et al. Bleeding diathesis in Noonan syndrome: a common association. *American Journal of Medical Genetics* 1988; 31:305-317.
6. Sharland M, Patton M, Chittolie A et al. Coagulation factor abnormalities in Noonan syndrome. *J Med Genet* 1990;27:645-661.
7. Sharland M, Patton MA, Talbot S et al. Coagulation factor deficiencies and abnormal bleeding in Noonan's syndrome. *The Lancet* 1992;339:4.
8. Bertola DR, Carneiro JD, D'Amico EA et al. Hematological findings in Noonan syndrome. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 2003;58:5-8.
9. Staudt JM, Van der Horst CM, Peters M et al. Bleeding diathesis in Noonan syndrome. *Scand F Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2005;39:247-248.
10. Massarano AA, Wood A, Tait RC et al. Noonan syndrome: coagulation and clinical aspects. *Acta Paediatr* 1996;85:1181-1185.
11. Singer ST, Hurst D, Addiego JE Jr et al. Bleeding disorders in Noonan syndrome: three case reports and review of literature. *Journal of Pediatric Hematology/oncology* 1997;19(2):130-134.