



Età dipendenza dei caratteri di Ghent scheletrici e correlazione genotipo/fenotipo nella sindrome di Marfan

Peschiera V.¹, Mosconi M.¹, Rossi S.M.P.¹, Arbustini E.², Favalli V.²,
Disabella E.², Benazzo F.¹

¹*Clinica Ortopedica e Traumatologica, e* ²*Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

INTRODUZIONE

La Sindrome di Marfan (MFS, MIM 154700) è una patologia multisistemica del tessuto connettivo, che si trasmette con modalità autosomica dominante. La malattia ha una prevalenza di circa 3 su 10000 individui [1] senza preferenze riguardo al sesso o all'etnia. La malattia è causata da mutazioni del gene della Fibrillina 1 (Cr15q15-21), che codifica per l'omologa proteina FBN1 [2] che concorre alla formazione delle fibre elastiche e delle fibre collagene della matrice extracellulare. Le caratteristiche principali della patologia riguardano alterazioni a livello del sistema cardiovascolare, scheletrico, oculare e nervoso. Circa il 75% dei pazienti ha una storia familiare positiva, mentre nel 25% dei casi non c'è evidenza di familiarità e le mutazioni del gene *FBN1* sono *de novo*. La malattia ha penetranza

completa, spesso età-dipendente, ma presenta un'estrema variabilità intra- e inter-familiare. Il coinvolgimento maggiore dell'apparato cardiovascolare, con dilatazione aneurismatica e/o dissecazione del bulbo aortico e dell'aorta ascendente, è il fattore prognostico più importante sia in termini di mortalità che morbilità. Il progresso nelle tecniche di sostituzione e riparazione chirurgica dell'aorta, l'introduzione della terapia medica con β -bloccanti e più recentemente con i bloccanti del recettore dell'angiotensina II [3-4], associate a una maggiore accuratezza diagnostica, hanno permesso di aumentare l'aspettativa di vita di circa 30 anni dal 1970 a oggi [5-6]. La diagnosi precoce è importante, poiché soggetti diagnosticati prima dei 18 anni hanno una minor necessità di interventi cardiocirurgici (33% vs 59%) ed un *outcome* più favorevole [7]. La diagnosi non è però sempre semplice, in quanto il fenotipo della malattia è evolutivo; la comparsa di alcune caratteristiche è età-dipendente [8] ed almeno un quarto dei casi è sporadico. Questo diminuisce l'efficacia dei criteri diagnostici internazionali di Ghent [9], elaborati sulla base del classico coinvolgimento multidistrettuale della MFS, che spesso si rende evidente in tutti i suoi aspetti solo nell'età adulta. Questa ricerca si propone di analizzare il rapporto tra età e presentazione fenotipica nella Sindrome di Marfan, di verificare se la presenza del criterio maggiore scheletrico sia correlata ad un fenotipo più severo a carico degli altri organi/apparati normalmente coinvolti nella sindrome stessa, e, inoltre, di stabilire se esiste un rapporto tra il tipo e la sede della mutazione e l'età di comparsa dei segni scheletrici, la loro severità clinica e l'eventuale copresenza con gli altri segni della nosologia secondo Ghent.

MATERIALI E METODI

I criteri di inclusione nello studio sono stati:

- 1) Espressione fenotipica della sindrome.
- 2) Presenza di una mutazione patologica del gene *FBNI* accertata mediante analisi molecolare presso il laboratorio del Centro di Malattie Genetiche Cardiovascolari dell'IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia.
- 3) Pazienti giunti all'osservazione o seguiti per controlli clinici periodici nel periodo compreso tra il gennaio 2007 e il giugno 2009 presso lo stesso Centro.

In un totale di 407 pazienti afferenti al Centro di Malattie Genetiche Cardiovascolari dell'IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia tra il 2005 e il 2009 è stata riscontrata una mutazione del gene *FBNI*; di questi 214 pazienti erano di sesso maschile (53%) e 193 di sesso femminile (47%). Di tutti questi pazienti 100 sono stati esclusi dallo studio poiché non soddisfacevano i criteri di inclusione non essendo stati regolarmente monitorati presso il Centro di Malattie Genetiche Cardiovascolari. Dei 307 pazienti inclusi nello studio 167 (54%) sono di sesso maschile e 140 (46%) di sesso femminile. La maggior parte dei pazienti sono caucasici, provenienti da ogni regione d'Italia. L'età dei pazienti va da 0 a 78 anni, la media è di 29.7 e la mediana di 28.5 anni. La popolazione in studio è stata suddivisa, in base ai fini dello studio stesso, in tre gruppi di età: pazienti fino ai 10 anni compresi (47 pazienti (15%) di cui 33 (70%) di sesso maschile e 14 (30%) di sesso femminile; età media 6.8 anni e mediana 7 anni), pazienti dagli 11 ai 18 anni compresi (45 pazienti (15%) di cui 26 (58%) di sesso maschile e 19 (42%) di sesso femminile; età media 14.53 e mediana di 15 anni), e pazienti di età superiore a 18 anni (215 pazienti

(70%) di cui 108 (50%) di sesso maschile e 107 (50%) di sesso femminile; età media 39.36 e mediana di 40 anni). La maggior parte dei pazienti della nostra serie clinica è compresa nel gruppo degli adulti (maggiori di 18 anni); questo dato rappresenta una caratteristica peculiare dei soggetti Marfan che giungono all'osservazione e quindi alla successiva diagnosi. È importante ricordare che la sindrome ha una penetranza completa, ovvero si presenta in tutti i soggetti che hanno una mutazione patologica del gene della Fibrillina 1, mentre il fenotipo è evolutivo, perciò sia il sospetto clinico che la diagnosi risultano più problematici in età pediatrica e nei soggetti adolescenti. Gli adulti invece giungono all'osservazione quando la malattia è conclamata: per il riscontro occasionale di una dilatazione del bulbo aortico, per la comparsa di un evento cardiovascolare acuto come una dissecazione aortica o la rottura di un aneurisma dell'aorta ascendente nel soggetto stesso o in un parente o infine per il *counseling* genetico in previsione di una gravidanza o per la diagnosi pre-impianto.

L'*iter* diagnostico del soggetto con sospetta sindrome di Marfan prevede l'attuazione della visita specialistica ortopedica, cardiologica e oculistica, un prelievo di sangue per la ricerca di una mutazione patologica del gene *FBNI* e di alcuni accertamenti eventuali come la RMN lombosacrale qualora necessari per la diagnosi. A completamento del percorso viene eseguita una consulenza genetica per il paziente e la famiglia, che raccoglie l'anamnesi patologica prossima e remota di tutti i componenti del nucleo familiare. Tutti i dati relativi a ciascun paziente sono stati raccolti in un *database* appositamente creato. Per ciascun soggetto sono stati catalogati i dati anagrafici, il genere, il tipo di mutazione identificata e la sede della mutazione all'interno del gene *FBNI* (esone). Nei casi in cui l'analisi

genetica è stata allargata ai familiari del probando è stato possibile stabilire se la mutazione fosse familiare o *de novo* e questo dato è stato inserito nella raccolta. Sono state quindi catalogate tutte le informazioni ottenute attraverso la valutazione multidisciplinare: la presenza/assenza di tutti i caratteri maggiori e minori di Ghent e altre caratteristiche salienti emerse dalle visite specialistiche; in particolare sono stati considerati i dati relativi all'ultimo controllo effettuato dal paziente presso il Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari nel periodo compreso tra il gennaio 2007 e il giugno 2009.

La statistica descrittiva è stata svolta tenendo conto di media e deviazione standard per le variabili continue e delle frequenze assolute e percentuali per le variabili categoriche. Al fine di caratterizzare la significatività della differenza tra gruppi all'interno della popolazione si è utilizzato il test esatto di Fisher per variabili categoriche, e il t-test per variabili continue: si è considerato significativo in un test a 2-code il valore di $p < 0.05$.

Il limite principale dello studio è rappresentato dal fatto che non tutti i pazienti sono stati sottoposti ad alcuni esami strumentali, in particolare le radiografie del bacino e del rachide e la RMN lombo sacrale. Per quanto riguarda le radiografie i motivi per cui non sono state eseguite sono stati: paura dei pazienti o dei genitori di soggetti minori per la somministrazione di radiazioni durante l'esame, alterazioni all'esame obiettivo non accompagnate da sintomatologia nel paziente, scarsa *compliance* (esami richiesti ma non eseguiti), criteri di Ghent per la diagnosi di MFS già soddisfatti oppure diagnosi di scoliosi o protrusione dell'acetabolo già posta in altri centri. Per quanto riguarda la risonanza magnetica, negli adulti i problemi maggiori sono rappresentati dalla claustrofobia e dall'assenza di sintomatologia, mentre per quanto riguarda i bambini non viene posta

l'indicazione a questa procedura per la necessità di una sedazione e per la durata dell'esame stesso (maggiore di 30 min), in mancanza di una sintomatologia riferibile alla presenza di ectasia durale.

RISULTATI

Su un totale di 307 pazienti in 273 (89%), è stato possibile porre diagnosi di Sindrome di Marfan secondo la nosologia di Ghent, mentre una mutazione patologica del gene della Fibrillina 1 è stata riscontrata in tutti i soggetti studiati. Il riscontro positivo riguardo ai criteri diagnostici presenta un evolutività età-correlata: nel gruppo di pazienti fino a 10 anni essa è infatti 82% e sale al 95% nei pazienti adolescenti, mentre la frequenza di Ghent-positivi nella popolazione adulta ricalca la media della popolazione generale (figura 1). Questi dati concordano con quelli presenti in letteratura [10-11].

I dati riguardanti la positività ai criteri maggiori e al coinvolgimento secondo la nosologia di Ghent per ciascun organo/apparato sono riassunti in tabella 1 dove vengono confrontati con quelli presenti in letteratura. Il criterio maggiore scheletrico, risultante dalla presenza di almeno quattro delle otto caratteristiche maggiori secondo Ghent, è risultato presente nel 24% dei soggetti. La protrusione dell'acetabolo, ancorché presente tra queste caratteristiche maggiori, non è stata considerata ai fini dello studio per l'esiguo numero di pazienti sottoposti ad un esame radiografico diagnostico. Il criterio maggiore scheletrico è presente nel 28% dei pazienti del gruppo in età pediatrica (≤ 10 anni), nel 31% degli adolescenti e nel 22% degli adulti.

Il coinvolgimento dell'apparato scheletrico è presente nel 54% dei soggetti, rispettivamente il 46%, 69% e 66% nei tre gruppi crescenti di età. I caratteri scheletrici tendono a manifestarsi con maggior frequenza nel gruppo degli

adolescenti (tra 10 e 18 anni), rispetto al gruppo pediatrico (≤ 10 anni). Alcuni tratti, come la scoliosi, sia superiore che inferiore a 20° , e la cifosi aumentano ulteriormente nel gruppo degli adulti, come evidenziato nelle figure 2 e 3. Nel gruppo dei pazienti pediatrici (≤ 10 anni) e nel gruppo degli adolescenti (tra 10 e 18 anni) i soggetti che non arrivano alla definizione del criterio maggiore scheletrico perché presentano solo tre dei tratti scheletrici maggiori. Questo rende conto dell'evoluitività di questa patologia e della necessità di uno stretto monitoraggio clinico e radiografico, in particolare nel periodo di maggiore crescita ossea. Tutti i soggetti che presentano il criterio maggiore scheletrico in tutti i gruppi di età sono affetti dalla sindrome di Marfan secondo i criteri clinici di Ghent per la contemporanea presenza del criterio maggiore oculare, cardiovascolare o nervoso.

La relazione tra la presenza del criterio maggiore scheletrico e gli altri criteri maggiori e i coinvolgimenti secondo la nosologia di Ghent nella nostra popolazione è mostrata in tabella 2.

Un totale di 307 mutazioni patologiche del gene *FBNI* sono state riscontrate nei 307 pazienti. La distribuzione delle mutazioni è presentata in figura 4. Delle 144 mutazioni *missense* (48% del totale delle mutazioni), 63 coinvolgono una cisteina (21%). Le mutazioni *nonsense*, generanti un codone di stop prematuro (PTC), sono state 64 (21%). Le mutazioni a livello dei siti di *splicing* sono state 45 (15%); delezioni e inserzioni sono state riscontrate in 33 pazienti affetti (11%), mentre grosse delezioni comprendenti anche un intero allele o riarrangiamenti intragenici sono stati rilevate in 18 soggetti (6%). Questi dati sono assolutamente sovrapponibili a quelli riportati in letteratura. Per quanto riguarda l'analisi del tipo di mutazione presente nei pazienti con criterio maggiore o coinvolgimento

scheletrico, il dato più significativo è l'aumento relativo delle mutazioni *missense* coinvolgenti una cisteina nei pazienti con criterio maggiore scheletrico in età pediatrica. Nello svolgimento dello studio sono state analizzate tre coppie di gemelli omozigoti per valutare eventuali differenze nella presentazione dei tratti fenotipici scheletrici in pazienti con identica mutazione del gene *FBNI*. Due delle tre coppie di gemelli presentavano caratteri fenotipici scheletrici identici, mentre nella terza coppia un gemello soddisfaceva il criterio maggiore scheletrico per la presenza di scoliosi $>20^\circ$, piede piatto, rapporto $\text{span/h} > 1.05$ e positività del segno del polso e del pollice, mentre il secondo gemello presentava solo un coinvolgimento dell'apparato locomotore. Questa differenza tra i due gemelli sembra comunque ridursi nel tempo, poiché durante l'ultima visita di controllo è stata riscontrata una lieve scoliosi anche nel secondo gemello, tratto precedentemente assente.

Alla luce dell'evoluitività di questa patologia è opportuno procedere con uno stretto *follow up* per verificare se in futuro, soprattutto durante la fase di maggior crescita ossea, queste differenze tenderanno a ridursi oppure ad accentuarsi.

DISCUSSIONE

La diagnosi di sindrome di Marfan dipende dalla compresenza di tratti maggiori specifici a livello dell'apparato scheletrico, cardiovascolare, oculare e nervoso, dal coinvolgimento di altri apparati e dal riscontro di una mutazione patologica del gene *FBNI*. L'importanza del criterio maggiore scheletrico è legata soprattutto alla diagnosi delle forme *de novo*. Nella nostra serie, il criterio maggiore scheletrico si è dimostrato un dato fondamentale per la diagnosi nel 23.5% dei bambini, nel 28.5% degli adolescenti e nel 18% dei soggetti adulti. Ricordiamo che in pazienti con

storia familiare negativa per sindrome di Marfan per la diagnosi clinica è necessaria la presenza di due criteri maggiori in due differenti organi o apparati, e il coinvolgimento di un terzo organo/apparato. Per quanto riguarda i pazienti con malattia familiare, la diagnosi viene posta riscontrando un solo criterio maggiore in un organo/apparato e il coinvolgimento di un secondo distretto, poiché la familiarità rappresenta di per sé un criterio maggiore. In questi pazienti il coinvolgimento scheletrico è utile ma non determinante per la diagnosi, coesistendo in tutti i casi con un ulteriore coinvolgimento a carico dell'apparato cardiovascolare, oculare, respiratorio o tegumentario.

Lo studio ha verificato inoltre che esiste una età dipendenza nella comparsa dei segni scheletrici di Ghent, in particolare l'aracnodattilia, il segno del polso, il segno del pollice, il rapporto span/altezza >1.05 , il petto escavato e il piede piatto presentano una frequenza maggiore nei pazienti adolescenti rispetto ai pazienti pediatrici. Le deformità del rachide, ovvero scoliosi $<20^\circ$, scoliosi $>20^\circ$ e cifosi presentano un aumento di incidenza progressivo a partire dall'età pediatrica fino all'età adulta.

La conferma di questo dato sottolinea l'importanza di procedere a un attento *follow-up* di soggetti con sospetta MFS in età pediatrica poiché alcuni tratti tipici della malattia possono rendersi manifesti solo successivamente. La sindrome ha una penetranza completa, ma l'espressione fenotipica presenta variabilità anche a livello intra-familiare. Nel presente studio è stato evidenziato come questa variabilità possa addirittura presentarsi in soggetti geneticamente identici come i gemelli omozigoti. La distribuzione dei tipi di mutazione nella popolazione con criterio maggiore o coinvolgimento scheletrico è sostanzialmente sovrapponibile a quella della popolazione totale dello studio, così come a quelle riportate in letteratura; un'eccezione è

rappresentata dal riscontro di una percentuale pari al 38% di mutazioni *missense* coinvolgenti una cisteina nei bambini (≤ 10 anni) con criterio maggiore scheletrico. I pazienti con criterio maggiore scheletrico sembrano presentare anche un fenotipo più severo a carico dell'apparato cardiovascolare, oculare e del sistema nervoso, differente nei tre gruppi di età.

Nello svolgimento del presente studio si sono palesati alcuni limiti dei criteri diagnostici scheletrici raccolti nella nosologia di Ghent. In particolare è stata riscontrata nella popolazione in studio un'elevata incidenza di cifosi (25%), tratto non considerato tra gli attuali criteri diagnostici; inoltre è risultato difficile sottoporre i pazienti a esami radiografici per la determinazione esatta del grado di scoliosi e della protrusione dell'acetabolo, tratti che quindi sono stati spesso sotto diagnosticati (scoliosi $>20^\circ$) o addirittura non considerati per la diagnosi (protrusione dell'acetabolo). Per questo motivo la ricerca futura si impegnerà nello sviluppo di nuovi algoritmi diagnostici per permettere una diagnosi precoce della malattia, necessaria per il trattamento precoce delle complicanze, soprattutto a carico dell'apparato cardiovascolare. L'aumento dell'aspettativa di vita dei pazienti con sindrome di Marfan impone inoltre una maggiore accuratezza nella diagnosi di alterazioni scheletriche come la scoliosi e la protrusione dell'acetabolo, le quali possono decorrere in modo del tutto asintomatico nel paziente pediatrico e adolescente, ma che possono determinare un'importante riduzione della qualità della vita in età adulta e anziana.

Criteri di Ghent	<i>Nostro studio</i> (n=307)	<i>Studio di Faivre</i> (n=1013)
<i>Scheletrico</i>		
<i>Maggiore</i>	24%	54%
<i>Involvement</i>	32%	56%
<i>Oculare</i>		
<i>Maggiore</i>	48%	19%
<i>Involvement</i>	54%	
<i>Cardiovascolare</i>		
<i>Maggiore</i>	87%	79%
<i>Involvement</i>	79%	11%
<i>Polmone</i>		
<i>Involvement</i>	5%	7%
<i>Cute</i>		
<i>Involvement</i>	29%	47%
<i>Sistema nervoso centrale</i>		
<i>Maggiore</i>	85%	15%
<i>Gene FBN 1</i>		
<i>Involvement</i>	100%	100%

Tabella 1. Positività ai criteri maggiori e *involvement* dei diversi organi/apparati. Confronto tra il presente studio e quello di Faivre e colleghi del 2007 [10].

Criteri di Ghent	<i>Gruppo</i> <i><10 anni</i>	<i>Gruppo >10</i> <i>e <18 anni</i>	<i>Gruppo</i> <i>>18 anni</i>
<i>Cardiovascolare</i>			
<i>Maggiore</i>	100%	100%	79%
<i>Involvement</i>	85%	100%	72%
<i>Oculare</i>			
<i>Maggiore</i>	38%	60%	44%
<i>Involvement</i>	23%	10%	26%
<i>Sistema nervoso centrale</i>			
<i>Maggiore</i>	50%	0%	91%
<i>Polmone</i>			
<i>Involvement</i>	8%	0%	8%
<i>Cute</i>			
<i>Involvement</i>	0%	0%	46%

Tabella 2. Relazione tra la presenza di criterio maggiore scheletrico e altri criteri maggiori nei diversi gruppi di età.

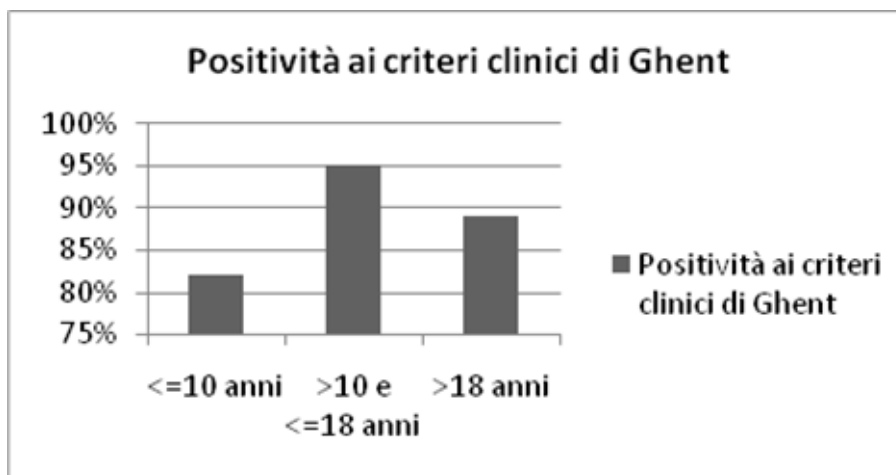


Figura 1. Positività ai criteri di Ghent, distribuzione per età.

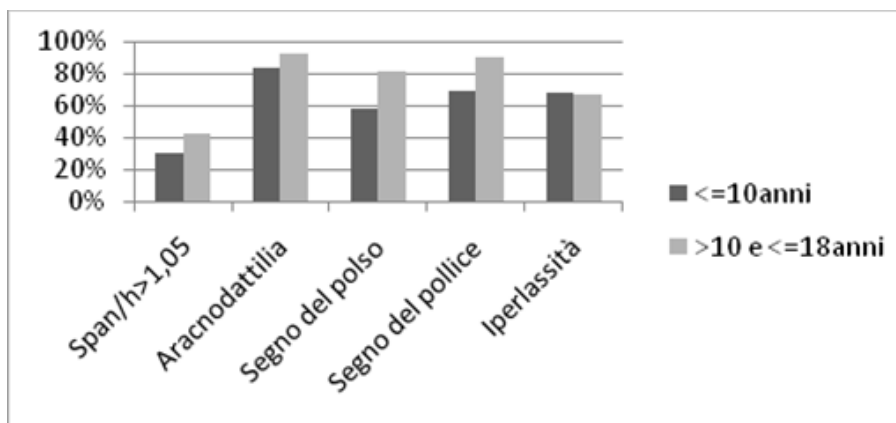


Figura 2. Positività ad alcuni dei tratti scheletrici tipici, confronto tra il gruppo dei bambini e quello degli adolescenti.

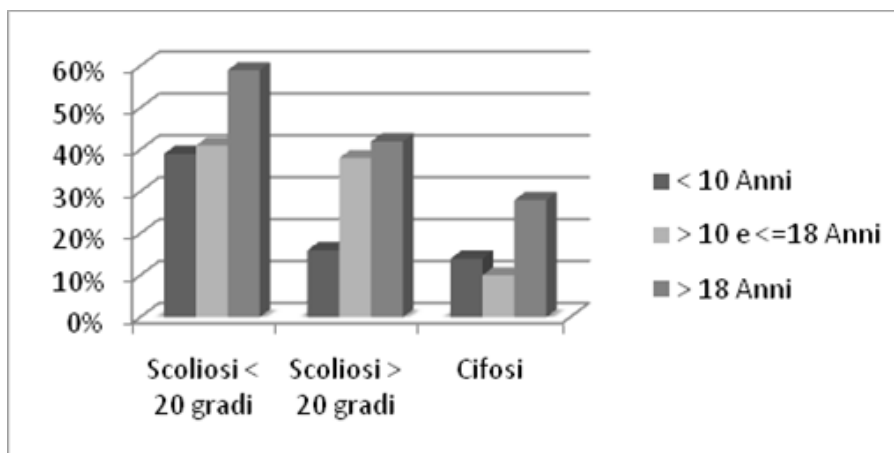


Figura 3. Deformità scheletriche, distribuzione per età.

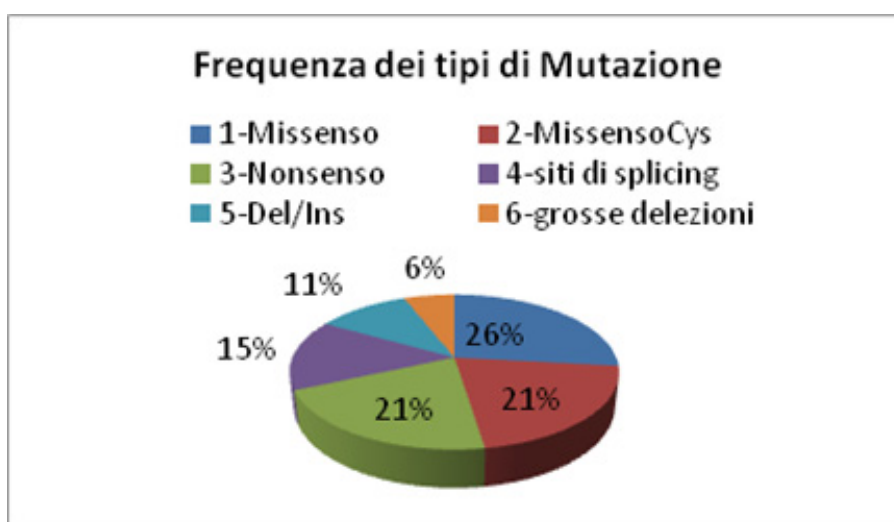


Figura 4. Distribuzione dei tipi di mutazione.

RIASSUNTO

La Sindrome di Marfan è una patologia del tessuto connettivo a penetranza completa, con trasmissione autosomica dominante. L'estrema variabilità fenotipica della patologia è nota; qui è stato dimostrato come possa addirittura presentarsi in soggetti geneticamente identici come i gemelli

omozigoti. Il presente studio ha inoltre confermato l'età dipendenza della comparsa dei tratti fenotipici scheletrici, che spesso sono i primi a spingere il paziente ad un iniziale screening per la malattia. La nostra esperienza ha anche mostrato alcune lacune nei criteri diagnostici internazionali di Ghent, che possono mancare la diagnosi, soprattutto nei bambini e negli adolescenti. Questi dati denotano la necessità di uno stretto *follow-up* nei soggetti con sospetta MFS in età pediatrica e dello sviluppo di nuovi algoritmi diagnostici per la diagnosi precoce, fondamentale per permettere una corretta prevenzione e cura delle complicanze, soprattutto a livello cardiovascolare.

SUMMARY

Marfan Syndrome is an autosomal dominant disorder of the connective tissue, with complete penetrance. The phenotype is extremely variable, both among than within affected families. Here we show that the variability also recurs between genetically identical individuals (homozygous twins). Our study also confirms the age dependent onset of skeletal manifestations, which often drive the patient to the first screening for MFS. Based on our data the international Ghent criteria miss diagnosis in 18% of children and 5% of adolescents. This observation underlines the need for a regular monitoring of pediatric patient with suspected MFS, and of new algorithms for early diagnosis, that is a basic issue for therapeutic management of all phenotypical manifestations.

BIBLIOGRAFIA

1. Pyeritz RE. Marfan syndrome: current and future clinical and genetic management of cardiovascular manifestation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1993;5(1):11-16

2. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991;352(6333):337-339
3. Milewicz DM, Dietz HC, Miller C et al. Treatment of Aortic Disease in Patients With Marfan Syndrome. *Circulation* 2005;111:e150-e157
4. Judge DP, Dietz HC. Therapy of Marfan syndrome. *Annu Rev Med* 2008;59:43-59
5. Pyeritz RE. Marfan syndrome: 30 years of research equals 30 tears of additional life expectancy. *Heart* 2009;95:173-175
6. Silverman DI, Burton KJ, Gray J et al. Life expectancy in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol* 1995;75(2):157-160
7. Willis L, Roosevelt GE, Yetman AT. Comparison of clinical characteristics and frequency of adverse outcomes in patients with marfan syndrome diagnosed in adulthood versus childhood. *Pediatr Cardiol* 2009;30(3):289-292
8. Lipscomb KJ, Clayton-Smith J, Harris R. Evolving phenotype of Marfan's syndrome. *Arch Dis Child* 1997;76(1):41-46
9. De Paepe A, Devereux R, Dietz H et al. Revised diagnostic criteria for the Marfan Syndrome. *Am J Med Genet A* 1996;62:417-426
10. Faivre LCBG, Loeys BL, Child A et al. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. *Am J Hum Genet* 2007;81:454-466
11. Faivre L, Masurel-Paulet A, Collod-Bérout G et al. Clinical and molecular study of 320 children with Marfan Syndrome and related type1 fibrillinopathies in a series of 1009 probands with pathogenic FBN1 mutations. *Am J of Ped* 2009;123:391-398

