

# 1

## Criteri diagnostici, diagnosi differenziale e monitoraggio clinico in età pediatrica

Claudia Santoro, Giulio Piluso



### IDENTIFICAZIONE DEL GENE E DIAGNOSI MOLECOLARE

Sebbene la prima descrizione di un paziente affetto da neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) si possa probabilmente collocare circa 1500 anni a.C.,<sup>1</sup> bisogna attendere il 1882 per avere, ad opera del patologo tedesco Friedrich D. von Recklinghausen, la definizione di “neurofibromatosi” riferita al tipo di lesioni tumorali caratteristiche della condizione.<sup>2</sup>

Solo nel 1990, a più di un secolo di distanza, due gruppi indipendenti coordinati dal Prof. Francis S. Collins e dal Prof. Frank McCormick riuscirono a identificare il gene *NF1*.<sup>3, 4</sup> Oggi noi sappiamo che il gene *NF1* si estende per circa 300.000 basi del cromosoma 17, citobanda q11.2, e risulta costituito da 60 esoni, intervallati da introni talora piuttosto ampi, con almeno due trascritti principali espressi in maniera ubiquitaria e, a più alti livelli, nel sistema nervoso centrale. Sono inoltre descritte numerose isoforme minori, prodotto dello splicing alternativo a carico di alcuni esoni. Il prodotto proteico è la neurofibromina, una proteina di circa 250-280 kDa con molteplici domini funzionali e interattori. In particolare, con il suo dominio *GAP-related domain* (GRD) con attività GTPasica sulla proteina Ras, la neurofibromina è coinvolta nella modulazione dell'at-

tività di Ras in specifici *pathway* di trasduzione del segnale a livello cellulare.

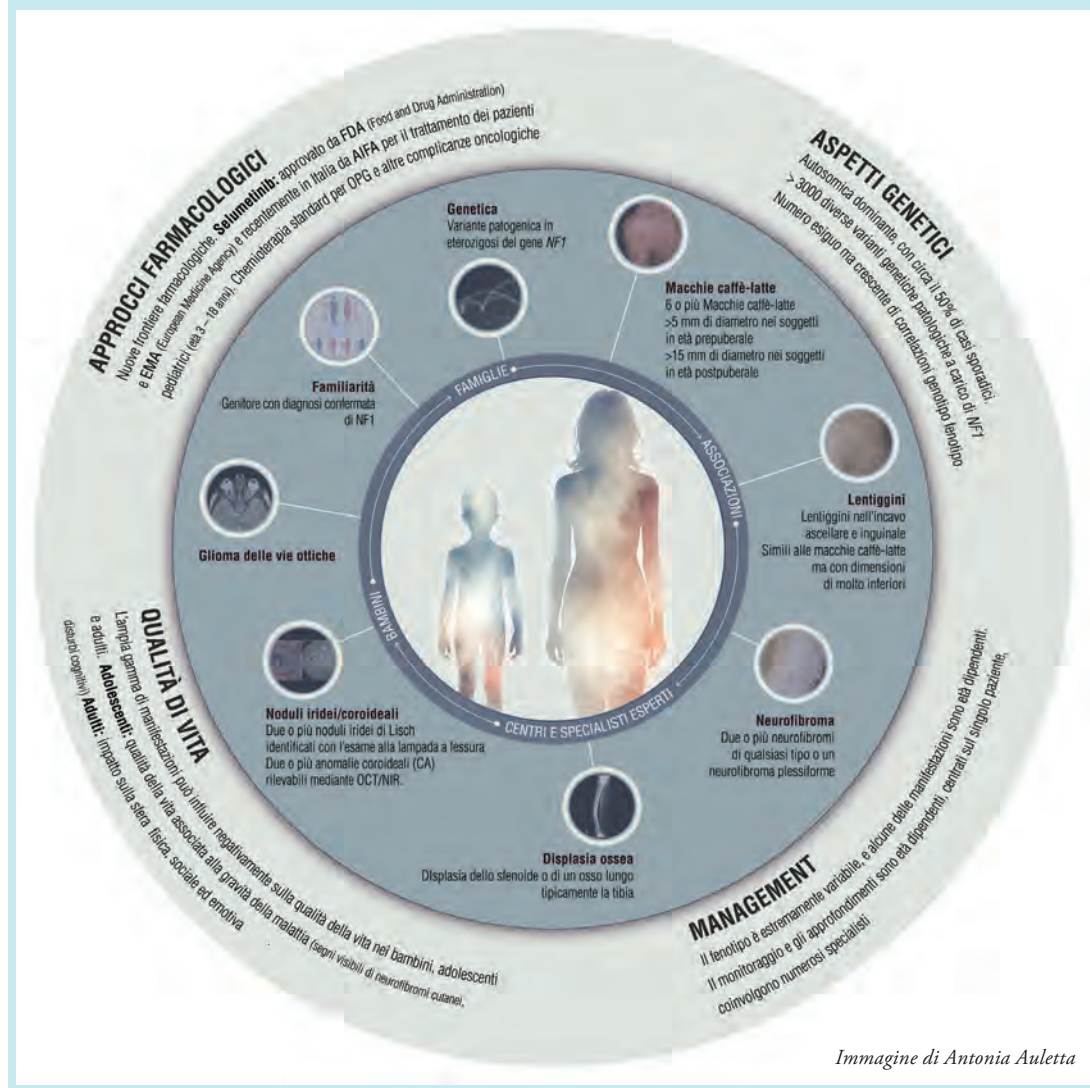
La NF1 è una condizione monoallelica a eredità autosomica dominante in cui, alleli amorfi o ipomorfi sono causa della malattia.<sup>5</sup> Il gene *NF1* è quindi sensibile all'aploinsufficienza e, pertanto, entrambi gli alleli devono essere funzionali per preservare la sua attività. Come è noto, circa il 50% dei casi sono forme familiari, in cui l'allele mutato è ereditato da uno dei genitori affetti dalla NF1, mentre la restante parte dei casi sono forme sporadiche, dovute a mutazioni *de novo* che interessano la linea germinale di uno dei due genitori, spesso correlabili all'età paterna avanzata. Non sono infrequenti forme a mosaico, dipendenti da mutazioni post-zigotiche in stadi più o meno avanzati dello sviluppo embrionale.

Come conseguenza dell'identificazione del gene e della sua caratterizzazione, si è passati da una diagnosi spesso esclusivamente clinica a una diagnosi molecolare che oggi è a pieno titolo inclusa nei criteri diagnostici della NF1,<sup>6</sup> tanto più utile in età pediatrica quando i segni precoci della malattia potrebbero non soddisfare i criteri diagnostici così come definiti nel 1987 dalla National Institute of Health Consensus Conference (**Fig. 1.1** e **Tab. 1.1**), di recente revisionati.<sup>6, 7</sup>

Con l'avvento delle nuove tecnologie di sequenziamento massivo (*next generation sequen-*



**Fig. 1.1** Rappresentazione grafica dei criteri diagnostici revisionati, e dei principali aspetti generali relativi alla NF1.



cing, NGS), la diagnosi molecolare è diventata una componente importante del percorso diagnostico del paziente con NF1 e, come dettagliato del successivo capitolo, l'identificazione di specifiche varianti del gene *NF1* può avere un impatto su quella che sarà l'evoluzione della malattia e il percorso di monitoraggio clinico del paziente.

Nella **Tabella 1.II**<sup>8-12</sup> sono elencati i test genetici attualmente in uso per la diagnosi della NF1. Altre metodiche, come ad esempio l'analisi cromosomica mediante *microarray* (array-CGH), possono integrare le precedenti in casi particolari.<sup>13</sup> In genere, la quasi totalità dei pazienti NF1 riceve una diagnosi molecolare con i test genetici attualmente in uso.<sup>10</sup> Per la



**Tab. 1.I. Criteri diagnostici revisionati per la NF1 (confronto con NIH Consensus Conference).**

Criterio diagnostico	NIH Consensus <sup>7</sup>	Revisione 2021 <sup>6</sup>
<b>A) I criteri diagnostici per NF1 sono soddisfatti in un individuo che non ha un genitore con diagnosi di NF1 se sono presenti due o più dei seguenti elementi:</b>		
≥6 macchie caffè-latte (CALMs) con diametro >5 mm in età prepuberale e >15 mm di età postpuberale	✓	✓*
Lentiggini ascellare o inguinale	✓	✓
2 o più neurofibromi di qualsiasi tipo o un neurofibroma plessiforme	✓	✓
Glioma delle vie ottiche (OPG)	✓	✓
2 o più noduli iridei di Lisch identificati mediante esame con lampada a fessura	✓	✓
2 o più anomalie coroidali, identificate mediante OCT.		✓
Una lesione ossea caratteristica come la displasia sfenoidale,** l'incurvamento anterolaterale della tibia o la pseudoartrosi di un osso lungo.	✓	✓
Una variante patogena in eterozigosi del gene <i>NF1</i>		✓
<b>B) Un figlio di un genitore che soddisfa i criteri diagnostici specificati in A merita una diagnosi di NF1 se sono presenti uno o più criteri in A</b>		
<small>CALMs: <i>café au lait macules</i> (macchie caffè-latte). OPG: <i>Optic Pathway Glioma</i>; OCT: <i>Optical Coherence Tomography</i>.            *La distribuzione delle CALMs o della lentiggini deve essere uniforme sulla superficie corporea; **la displasia dell'ala dello sfenoide non va considerata come criterio nel caso sia associata a neurofibroma plessiforme orbitale ipsilaterale.</small>		

**Tab. 1.II. Test genetici applicabili alla diagnosi della NF1 e sensibilità diagnostica.**

Metodica	Sensibilità del test
Sequenziamento del gene <i>NF1</i> (DNA genomico e/o cDNA) <sup>8-10</sup>	>95%
MLPA <sup>11, 12</sup>	5-13%
<small>MLPA: <i>multiple ligation-dependent probe amplification</i>.</small>	

piccola frazione di casi elusivi occorre probabilmente considerare meccanismi mutazionali complessi, comunque non rilevabili con le metodiche a cui abbiamo accennato. Nuove tecnologie emergenti come il *long-read sequencing* (LR-Seq) e l'*optical genome mapping* (OGM) possono aprire la strada alla loro caratterizzazione e comprensione.<sup>14-17</sup>

## DIAGNOSI DIFFERENZIALE

Il gene *NF1* rappresenta, di fatto, il primo gene codificante per una proteina della via di Ras, le

cui mutazioni siano state associate a una condizione patologica. Dal 2001, mutazioni in più di 20 geni sono state associate a condizioni patologiche che presentano alcuni elementi di sovrapposizione fenotipica e sono oggi classificate come RASopatie, includendo la stessa NF1.<sup>18</sup> Varianti patologiche sono state identificate in diversi geni della via *RAS-mitogen-activated protein kinase* (RAS-MAPK), e codificano per fosfatasi (*PTPN11*), componenti della cascata MAPK (*BRAF*, *RAF1*, *MAP2K1*, *MAP2K2* e *MAPK1*), membri della sottofamiglia delle RAS GTPasi (*HRAS*, *NRAS*, *MRAS*,



*RRAS*, *RRAS2* e *RIT1*) e regolatori sia negativi (*NF1*, *LZTR1*, *CBL* e *SPRED1*) che positivi (*SOS1*, *SOS2*, *SHOC2* e *PPP1CB*) della funzione di Ras.<sup>19</sup> La tendenza è quindi oggi quella di prevedere l'analisi NGS per pannelli di geni, commerciali o messi a punto dai diversi laboratori, da considerare in diagnosi differenziale con la NF1. Tale aspetto è tanto più rilevante in età pediatrica qualora i segni clinici non siano esclusivi della NF1.

### SINDROME DI LEGIUS

La Sindrome di Legius (LGGS; MIM 611431) è una condizione autosomica dominante causata da mutazioni nel gene *SPRED1* (MIM 609291)<sup>20</sup> che codifica per Spred1, un membro della famiglia delle proteine *Sprouty-related* contenenti il dominio EVH-1.<sup>21</sup> Questa proteina, analogamente alla neurofibromina, è un regolatore negativo della via di segnalazione Ras/MAPK.<sup>22, 23</sup> La LGGS è anche detta “*NF1-like syndrome*” proprio per il fenotipo cutaneo indistinguibile dalla NF1 e caratterizzato da macchie caffè-latte (*café au lait macules*, CALMs) e lentiggini in assenza però di neurofibromi o altre caratteristiche tipiche della NF1, come i noduli iridei di Lisch, le displasie ossee, e il glioma delle vie ottiche (*optic pathway glioma*, OPG).<sup>20, 24, 25</sup> L'identificazione della LGGS è sicuramente stato uno dei motivi che hanno condotto alla necessità di rivedere i criteri diagnostici. Se sono presenti solo CALMs e lentiggini, la diagnosi più probabile è NF1, ma eccezionalmente la persona potrebbe avere un'altra diagnosi come la LGGS. Pertanto, la diagnosi differenziale molecolare tra NF1 e LGGS in presenza di isolate manifestazioni cutanee è fondamentale in particolare età pediatrica, epoca in cui possono essere ancora assenti alcuni segni distintivi della NF1. Discriminare precocemente tra NF1 e LGGS è chiaramente importante in termini prognosti-

sti, vista l'assenza di rischio oncologico nella LGGS rispetto alla NF1, e per pianificare la gestione clinica più appropriata per il paziente.

### SINDROME DA DEFICIT CONGENITO DEL SISTEMA DI RIPARAZIONE DEI MALAPPAIAMENTI

Il deficit congenito del sistema di riparazione dei malappaiamenti del DNA (*constitutional mismatch repair deficiency*, CMMRD; MIM 276300) è una rara sindrome autosomica recessiva correlata alla predisposizione a differenti tipi di cancro a esordio precoce, tipicamente infantile. Si osservano per lo più, ma non esclusivamente, patologie oncoematologiche, e tumori maligni dell'encefalo, e dell'apparato gastrointestinale. La CMMRD è causata da mutazioni germinali bialleliche in uno dei quattro geni del *mismatch repair* (MMR): *MLH1* (MIM 120436), *MSH2* (MIM 609309), *MSH6* (MIM 600678), e *PMS2* (MIM 600259) che impattano negativamente sulla innata capacità di correggere i disallineamenti base-base e di inserzione/eliminazione di base che avvengono durante la replicazione e la ricombinazione del DNA. Si accumulano così, nei pazienti con CMMRD, varianti patogenetiche somatiche che danno ragione del rischio oncologico ma anche della possibilità di riscontrare segni clinici tipici di NF1. Il gene *NF1* è, infatti, uno dei geni a più alta frequenza di mutazioni spontanee e nella CMMRD mutazioni somatiche a carico del gene *NF1* spiegano la presenza di alcuni segni della NF1 come le CALMs e la lentiginosi ascellare e/o inguinale, ma anche i noduli di Lisch, ecc. Nei pazienti con CMMRD le manifestazioni cutanee assumono talvolta un *pattern* di distribuzione evocativo di mosaicismi che ben rispecchia il meccanismo patogenetico. Poiché le CALMs possono presentarsi molto precocemente rispetto allo sviluppo dei tumori, la CMMRD rientra tra le condizioni da





considerare in diagnosi differenziale in età pediatrica in tutti i bambini che hanno un'anamnesi genitoriale negativa per NF1 o LGGS e che hanno CALMs >5 o un segno tipico di NF1 associato ad almeno due ipercromie simili alle CALMs della NF1, in assenza di varianti patogenetiche germinali nei geni *NF1* e *SPRED1*, dopo estensiva analisi molecolare degli stessi.<sup>26</sup> Una diagnosi di CMMRD può interessare fino allo 0,41% dei casi sporadici con sospetto di NF1/LGGS e negativi a mutazioni causative in *NF1* e *SPRED1*.<sup>27</sup> Nel 2022 sono stati pubblicati dei criteri diagnostici e raccomandazioni per la CMMRD.<sup>28</sup> La diagnosi di CMMRD consente l'avvio di programmi di screening oncologico *ad hoc* con notevoli risvolti prognostici e terapeutici per il paziente affetto e un fondamentale impatto in termini di consulenza genetica per il rischio di ricorrenza nella famiglia.

## SINDROME DI NOONAN

La Sindrome di Noonan è una condizione autosomica dominante relativamente comune, caratterizzata da peculiarità facciali, bassa statura, difetti cardiaci congeniti, tra cui il più frequente è la stenosi della valvola polmonare (*pulmonary vein stenosis*, PVS), e cardiomiopatia ipertrofica.<sup>29</sup> Il gene *PTPN11* è responsabile della maggior parte dei casi di Sindrome di Noonan, tuttavia, molti altri geni sono coinvolti nella Sindrome di Noonan (*KRAS*, *SOS1*, *RAF1*, *MAP2K1*, *BRAF*, *NRAS*, *RIT1* e *LZTR1*).<sup>30</sup>

I pazienti con NF1 possono presentare diverse caratteristiche condivise con la Sindrome di Noonan tanto da poter identificare un fenotipo NF1-Noonan che include, bassa statura, ipertelorismo, rime palpebrali oblique verso il basso, impianto basso delle orecchie, collo palmato, petto scavato o carenato, e stenosi della valvola polmonare, che si osserva in circa il 12% dei pazienti con variante patogenetica in *NF1*.<sup>5</sup> La analisi molecolare mediante

NGS, utilizzando pannelli che includono anche i geni responsabili delle RASopatie, può quindi aiutare nel dirimere la diagnosi nei casi di sovrapposizione fenotipica tra NF1 e Sindrome di Noonan, prevalentemente associabili, in presenza di più di 5 CALMs a mutazioni in *NF1*,<sup>31</sup> ma anche più raramente a mutazioni in geni Noonan.<sup>32-34</sup>

Un aspetto emergente, certamente legato alla crescente disponibilità delle nuove tecnologie di analisi NGS, è l'eterogeneità genetica del fenotipo NF1-Noonan. Sono riportati alcuni casi in cui sono state identificate varianti patogenetiche sia in *NF1* che *PTPN11* (il gene più frequentemente mutato nella Sindrome di Noonan).<sup>35, 36</sup>

## FORME COMPLESSE DI NEUROFIBROMATOSI DI TIPO 1

Probabilmente a causa dell'elevata frequenza con cui le mutazioni occorrono nel gene *NF1*,<sup>37</sup> la NF1 è stata talora associata ad altre condizioni genetiche concomitanti che aiutano a spiegare le manifestazioni fenotipiche dei pazienti, conducendo a quadri clinici complessi in cui non tutte le caratteristiche sono riconducibili alla NF1. Abbiamo già ricordato la co-occorrenza di varianti patogenetiche in *NF1* e *PTPN11*, ma moltissimi altri esempi sono disponibili in letteratura in cui la NF1, spesso causata da mutazioni *de novo*, si associa a un'altra condizione genetica (ad es., la malattia di Huntington, una miopia congenita, il cancro al seno ereditario, ecc.).<sup>38</sup>

In tal senso, il passaggio da un'analisi NGS con pannelli selezionati di geni a un'analisi dell'intero esoma (*whole exome sequencing*; WES), può essere utile nel chiarire la basi genetiche in forme di NF1 complicate da concomitanti disturbi monogenici, fornendo una diagnosi molecolare più accurata e una consulenza genetica appropriata.<sup>39, 40</sup>



## ALTRE CONDIZIONI IN DIAGNOSI DIFFERENZIALE CON LA NEUROFIBROMATOSI DI TIPO 1

In realtà sono numerose le condizioni genetiche e le sindromi da anomalie multiple congenite in cui è possibile riconoscere caratteristiche individuali della NF1, sebbene sia poco probabile confondere quest'ultime con la NF1.<sup>5</sup> Oltre a quelle già citate in precedenza, altre condizioni genetiche che possono evidenziare elementi fenotipici condivisi con la NF1 sono riportate nella **Tabella 1.III** e, pur nella loro specificità, andrebbero considerate in diagnosi differenziale.

### LA GESTIONE CLINICA DELLA NF1

La gestione e il monitoraggio clinico-strumentale dei pazienti affetti da NF1, e dei casi sospetti, si basa su un approccio multidisciplinare alla cui base deve esserci una collaborazione at-

tiva tra più operatori sanitari con esperienza di questa specifica condizione genetica. Non appena si sospetti una diagnosi di NF1, è raccomandato un monitoraggio periodico che deve essere semestrale o annuale a seconda dei casi e dell'età. Ad esempio, fino al compimento del quarto anno di vita è preferibile uno screening oculistico e clinico semestrale mirato all'identificazione precoce del glioma delle vie ottiche, delle displasie ossee, in primis della tibia, e di eventuali ritardi dello sviluppo psicomotorio. Ad oggi non esiste comunque una consensus univoca sul monitoraggio dei pazienti con NF1. In età pediatrica, la visita periodica dovrebbe comprendere un esame fisico completo, la misurazione dei parametri auxologici comprensivi di circonferenza cranica, la misurazione della pressione sanguigna, la ricerca dei segni e sintomi clinici riconducibili alle complicanze età e non età specifica della NF1. Gli esami di risonanza magnetica (RM) di routine non sono raccomandati, specialmente considerando l'ele-

**Tab. 1.III. Altre condizioni in diagnosi differenziale con la NF1.**

Gene	Disordine	MIM	Ereditarietà	Caratteristiche cliniche
<i>AKT1</i>	Sindrome di Proteus	176920	MS	Crescita eccessiva amartomatosa di vari tessuti. nevi connettivali ed epidermici e iperostosi
<i>GNAS</i>	Sindrome di McCune-Albright	174800	MS	Ampie CALMs a contorni irregolari, displasia fibrosa poliostotica e disordini endocrinologici
<i>KIT</i>	Piebaldismo	172800	AD	Aree di pigmentazione e depigmentazione cutanea con bordi iperpigmentati e poliosi
<i>LZTR1</i> <i>SMARCB1</i>	Schwannomatosi	615670 162091	AD	Predisposizione a sviluppare schwannomi multipli, occasionalmente CALMs
<i>NF2</i>	Neurofibromatosi di tipo 2	101000	AD	Schwannoma vestibolare bilaterale, e altri tumori del sistema nervoso, manifestazioni oculari. Occasionalmente CALMs
<i>PDGFRB</i>	Miofibromatosi infantile	228550	AD	Tumori multipli della pelle, dei tessuti sottocutanei, e di altri tessuti

MS: mosaicismo somatico; AD: autosomico dominante.



vato costo biologico della sedazione spesso necessaria in tenera età, ma dovrebbero essere eseguiti solo alla luce di segni e/o sintomi sospetti. La **Tabella 1.IV** riassume le modalità di screening da seguire nel follow-up di pazienti con NF1, come suggerito dalla Rete NF Francese nel 2020 dopo un'ampia revisione della lettera-

tura.<sup>41</sup> Il monitoraggio dei pazienti affetti dovrebbe essere modulato in base alle manifestazioni del paziente, assai variabili da caso a caso. Per i pazienti ad alto rischio di complicazioni più gravi, ad esempio quelli con sindrome da microdelezione o varianti patogenetiche del gene *NF1* note per un particolare rischio di com-

**Tab. 1.IV. Screening per le complicanze più frequenti della NF1.**

Complicanze		Pazienti affetti	Modalità di screening/diagnosi
Manifestazioni dermatologiche	Neurofibromi sottocutanei, interni e/o plessiformi: trasformazione maligna?	Bambini, adulti	Esame clinico: Dolore, deficit neurologico, aumento delle dimensioni, ripercussioni funzionali e psicologiche
	Problemi estetici o funzionali?		Esami aggiuntivi: facoltativi
	Dolore, deficit neurologico, aumento delle dimensioni, ripercussioni funzionali e psicologiche		Indicazioni: sospetto di malignità, inestetismo, compressione strutture vitali
	JXG	Bambini	Esame obiettivo, consultazione dermatologo
Manifestazioni ortopediche	Displasia ossea e pseudoartrosi delle ossa lunghe, fratture	Bambini, adulti	Esame clinico: ricerca di gibbosità, deformità ossee. Radiografia se anomalie riscontrate all'esame clinico.
	Scoliosi	Bambini, adulti	Esame fisico ed esami aggiuntivi in caso di anomalie all'esame obiettivo:
			viste radiografiche in AP e LL della colonna vertebrale se vengono rilevate anomalie cliniche
			la RM dovrebbe essere riservata alle forme con displasia vertebrale e/o costale (consenso degli esperti)
test di funzionalità polmonare per valutare l'impatto della scoliosi grave			
Osteopenia, osteoporosi	Bambini, adulti	Considerare l'esecuzione di una densitometria ossea sulla base di esame clinico, livelli di vitamina D e immagini radiologiche evocative di osteopenia	
Manifestazioni endocrinologiche	Disturbi della pubertà e della crescita	Bambini	Seguire la crescita e lo sviluppo puberale, misurare la circonferenza cranica

(Continua)



**Tab. 1.IV. Screening per le complicanze più frequenti della NF1 (segue).**

Complicanze		Pazienti affetti	Modalità di screening/diagnosi
Manifestazioni cardiache e vascolari	Ipertensione essenziale e secondaria	Bambini, adulti	Esame obiettivo: misurazione della pressione arteriosa a ogni consultazione (almeno una volta all'anno), discutere la possibilità di misurazione ambulatoriale
			Cercare segni indicativi di feocromocitoma
	Ulteriori esami in caso di ipertensione di primo livello per ipertensione in generale associando eco color doppler delle arterie renali e/o angio-RM o angio-TC delle arterie renali Determinazione plasmatica e/o urinaria delle metanefrine negli adulti		
	Anomalie cardiache	Bambini, adulti	Esame clinico
	Manifestazioni emorragiche	Bambini, adulti	Valutare l'emostasi prima di qualsiasi procedura chirurgica, odontoiatrica o ostetrica
Dolore, ripercussioni psicologiche, qualità della vita		Bambini, adulti	Consulenza psicologica, rinvio di uno specialista del dolore
Manifestazioni otorinolaringoiatriche	Sordità, neurinoma, disturbi fonatori, neurofibroma laringeo	Bambini, adulti	Visita otorinolaringoiatrica
Manifestazioni neurologiche	OPG	Bambini	Colloquio: cadute ripetute che portano al sospetto di diminuzione dell'acuità visiva o limitazione del campo visivo
			Esame neurologico e oculare: strabismo, nistagmo, bassa acuità visiva, deficit neurologico, segni di ipertensione intracranica
			Pubertà precoce, deviazione dalla curva di crescita, misurazione della circonferenza cranica
			Screening oftalmologico almeno una volta all'anno fino all'età di 13 anni e poi se compaiono segni
			La risonanza magnetica delle vie ottiche e cerebrali non è sistematica e deve essere eseguita solo se si sospetta la presenza di OPG

(Continua)