

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE



CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI LAUREA

**Evoluzione staturale e sviluppo puberale in
pazienti affetti da Sindrome di Noonan: studio
retrospettivo su coorte monocentrica.**

Relatore:

Prof.ssa Natascia Di Iorgi

Correlatore:

Prof.ssa Giuseppa Patti

Candidato:

Chiara Morreale

Anno accademico 2020-2021

RINGRAZIAMENTI:

Desidero innanzitutto ringraziare la mia famiglia e soprattutto i miei genitori (mamma Apollonia e papà Gino) per avermi dato l'opportunità di conseguire questo titolo di studio lontano da casa. Loro sono stati un punto di riferimento durante tutto il mio percorso cercando di sostenermi sempre in tutti i modi possibili nonostante la distanza.

Un ringraziamento particolare va alla mia relatrice, la prof.ssa Natascia Di Iorgi per la sua dolcezza, la sua pazienza e la sua costante disponibilità che ha dimostrato durante tutto il mio percorso di ricerca. La ringrazio inoltre per avermi insegnato come fare ricerca e per avermi fatto capire a pieno quanto questa sia faticosa ma allo stesso tempo soddisfacente.

Ringrazio poi la mia correlatrice, la prof.ssa Patti per avermi introdotto nel mondo della sindrome di Noonan e per i consigli dati durante il mio percorso.

Ringrazio l'ospedale G. Gaslini e tutti i bambini (comprese le rispettive famiglie) che hanno partecipato al mio studio.

Un caloroso ringraziamento va ad Ab, un ragazzo splendido che si è sempre dimostrato comprensivo ed estremamente paziente durante tutti questi anni di Università nonostante i miei numerosissimi momenti di sconforto.

Un ringraziamento speciale va a tutti i miei amici, con i quali ho condiviso tantissimi momenti di ansia, gioia e di disperazione che hanno caratterizzato tutti questi anni.

Un grazie speciale a Sara ed Annalisa, con le quali ho condiviso dei momenti unici negli ultimi anni.

Infine, un ringraziamento particolare va al mio prof. di italiano del liceo classico G. Galilei di Legnano, il Professor Genoni, per avermi trasmesso di approccio critico allo studio, per avermi fatto capire l'importanza delle fonti e dell'espressione.

ABSTRACT

OBIETTIVI: Obiettivo primario è valutare l'accrescimento staturale in pazienti (pts) aventi sindrome di Noonan (SN) con (GHD) e senza deficit di ormone della crescita. Obiettivi secondari determinare l'impatto dell'attivazione puberale e della diagnosi molecolare sull'endpoint staturale.

METODI: sono stati raccolti retrospettivamente dati antropometrici (altezza-HTSDS, Tanner), biochimici (IGF1, LH, FSH, estradiolo/testosterone) di 22 pts (11M,11F) con SN geneticamente determinata (n=12 PTPN11, n=4 BRAF, n=3 KRAS, n=1 SOS1-RIT1-SHOC2) al baseline(T0), +6,+12,+24 mesi di GH, all'avvio puberale e all'ultimo follow-up(T5).

RISULTATI: Pts GHD(n=10) avevano a T0 una HTSDS più patologica rispetto ai non GHD: -3,0 SDS (range: -4,0- -2,0) vs -2,2(-4,2- -1,2), p=0,04 mantenendo tale trend staturale fino a T5: -2,7(-3,7- -0,4) vs -2,0(-5,2- -0,8) con un recupero staturale di 0,6 SDS (-0,2-1,6) vs 0,0(-1,4-0,9), p=0,08 dopo una mediana di 6,7 anni di terapia (tp) con GH. L'aderenza alla tp è confermata da valori di IGF1 incrementati durante il follow-up e diversi dai non GHD: 0,1 SDS (-3,1-2,8) vs -1,5(-3,8-0,5), p=0,03. Pts PTPN11 mutati (n=12) non si differenziavano da altre mutazioni(n=10) per la HTSDS nel tempo. Al T5 il guadagno era di 0,4 SDS per i PTPN11 e 0,1 per i non PTPN11. L'attivazione puberale (stadio G2/B2) in 8/22(n=5F e n=3M) si è verificata ad una età mediana di 12,1 anni, più precoce nelle F rispetto ai M: 10,5(9,4-16,6) vs 12,7(11,7-13,7). Delle 5 F, tutte in tp con GH, n=3 avevano un valore di LH dosabile prima di 8 anni suggestivo di pubertà precoce e una HTSDS più patologica a T5 rispetto alle F con LH dosabile dopo 8 anni(p=0,07). I M avevano un LH dosabile dai 12 anni.

CONCLUSIONI: lo studio conferma una bassa HTSDS nel 77,3% (no differenze in base alla mutazione genetica). Nonostante la tp, pts con SN e GHD mantengono una HTSDS patologica rispetto ai non GHD. Il riscontro di pubertà anticipata nelle F potrebbe giustificare un impatto negativo sulla HTSDS finale.

INDICE:

1.INTRODUZIONE	6
1.1 La sindrome di Noonan: generalità	6
1.1.1 Epidemiologia e storia	6
1.1.2 Presentazione fenotipica e comorbidità associate	6
1.2 Crescita	22
1.2.1 Fisiologia della crescita corporea	22
1.2.2 Ipostaturalità nella sindrome di Noonan:	23
1.3 Pubertà	32
1.3.1 Fisiologia pubertà:	32
1.3.2 Pubertà ritardata e spurt puberale nella sindrome Noonan:	33
1.4 Eziologia e RAS-MAPK Pathway	35
1.5 Mutazioni genetiche causative di sindrome Noonan	37
1.5.1 Prevalenza mutazioni	37
1.5.2 Storia e specificità	38
1.6 Relazione genotipo-fenotipo:	43
1.7 Diagnosi e diagnosi differenziale	44
1.7.1 Diagnosi sindrome di Noonan	44
1.7.2 Diagnosi differenziale con RASopatie e altre sindromi	46
1.8 Follow-up e trattamento	48
1. RAZIONALE DELLO STUDIO	52
2. DISEGNO DELLO STUDIO:	52
3. ENDPOINT DELLO STUDIO	52
4. PAZIENTI	53
5. METODI	54
5.1 Analisi statistica	55
6. RISULTATI	56
6.1 Descrizione della coorte in studio	56
6.2 Descrizione di antropometria, dati biochimici e radiografici alla prima valutazione (Baseline).	60
6.3. Andamento dell'antropometria, delle IGF-1 e dell'età ossea nel tempo, dalla nascita all'ultimo controllo (T5): confronto tra i pazienti GHD e non GHD.	62
6.4 Confronto antropometrico e biochimico tra pazienti con mutazione di PTPN11 e pazienti con altre mutazioni differenti da PTPN11.	73
6.5 Descrizione dell'attivazione Ipotalamo-Ipofisi-Gonadi: confronto tra sesso maschile e sesso femminile.	76

6.5.1	Impatto dell'età all'attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonadi sull'andamento staturale nella coorte femminile.....	77
6.6	Andamento staturale nel tempo in base al sesso e allo stadio puberale.	79
7.	DISCUSSIONE	80
7.1	Mutazioni e relazione genotipo-fenotipo	80
7.2	Andamento antropometrico nel tempo.....	81
	Pazienti GHD e non GHD.	81
7.3	Andamento antropometrico nel tempo: confronto tra pazienti PTPN11 e non PTPN11.	83
7.4	Attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonadi e impatto dell'età all'attivazione dell'asse sull'andamento staturale nella coorte femminile.....	84
8.	CONCLUSIONI.....	85
9.	BIBLIOGRAFIA	86

1.INTRODUZIONE

1.1 La sindrome di Noonan: generalità

1.1.1 Epidemiologia e storia

La Sindrome di Noonan è una condizione patologica multisistemica, ad ereditarietà per lo più autosomica dominante, a penetranza completa ed espressività variabile.

L'incidenza stimata varia da 1:1000 a 1:2500 nati vivi (1).

La definizione "sindrome di Noonan" deriva da Jacqueline Noonan, cardiologa pediatra presso l'Università del Kentucky, la quale riportò nel 1963 nove pazienti (6 maschi e 3 femmine) con stenosi della valvola polmonare, bassa statura, ipertelorismo, ritardo cognitivo lieve, ptosi, criptorchidismo e anomalie scheletriche ma tutti con cariotipo normale. Inizialmente questa condizione patologica fu definita "sindrome di Turner maschile" per il fenotipo Turner-like, ma si differenziava dalla sindrome di Turner per il coinvolgimento di entrambi i sessi e per il normale cariotipo. Nel 1965 fu poi identificata come entità clinica separata a cui fu attribuito il nome di sindrome di Noonan (2).

1.1.2 Presentazione fenotipica e comorbidità associate

Dal punto di vista fenotipico la sindrome di Noonan è caratterizzata da una eterogeneità di alterazioni cliniche ma le manifestazioni più tipiche che indirizzano il sospetto diagnostico sono: dismorfismi facciali, bassa statura e malformazioni cardiache congenite.

In maniera più dettagliata le manifestazioni fenotipiche e le relative comorbidità della sindrome di Noonan comprendono:

1) Dismorfismi facciali

Rappresentano le alterazioni che spesso pongono il sospetto iniziale verso la sindrome di Noonan. Alterazioni tipiche sono:

- Faccia triangolare, fronte alta e prominente;
- Anomalie a carico delle orecchie (44-90%): impianto basso e retroposto, elice ispessito (3);
- Anomalie oculari (95%): ptosi, ipertelorismo, rime palpebrali orizzontali o down-slanting cioè inclinate verso il basso, strabismo e/o difetti di rifrazione, ptosi, miopia e nistagmo, ambliopia, pieghe epicantali che coprono l'angolo mediale dell'occhio, ipoplasia del disco ottico, coloboma, cataratta, panuveite e distrofia stromale anteriore (1);

- Sopracciglia e ciglia rade o assenti (sono alterazioni rare ma più frequentemente associate a mutazioni di SOS1, BRAF e MAP2K1) (4);
- Nel 95% filtro naso-labiale allungato con punte accentuate del bordo del vermiglio del labbro superiore;
- Nel 95% collo corto o pterigium colli (cioè presenza di plica cutanea a livello del collo);
- Palato alto e arcuato (45%-34%), micrognazia (22%) (3);
- Malocclusione dentale (35%) e anomalie dentali (ritardo nell'eruzione, agenesia e distrofia, odontoma) riscontrate, in uno studio, in 5 pazienti su 10. Più rara è la presenza di neoplasia benigna a cellule giganti a carico soprattutto dell'osso mandibolare (riscontrata, nel medesimo studio, in 1 paziente su 10) (5);
- Attaccatura posteriore dei capelli (32%) e generalmente un terzo dei pazienti hanno capelli spessi e ricci mentre solo il 10% li ha radi e fini (6).

Questi dismorfismi risultano essere più spiccati e quindi più facilmente evidenziabili alla nascita e nella prima infanzia per poi modificarsi e attenuarsi in età adulta.

Generalmente, le modifiche cliniche che avvengono con l'età risultano essere:

- Nei **neonati** di frequente riscontro sono: fronte alta, rime palpebrali down-slanting e ipertelorismo, naso corto e largo con radice depressa e punta rivolta verso l'alto, filtro naso-labiale molto depresso con punte accentuate del vermiglio del labbro superiore, palato alto e arcuato, mento piccolo, micrognazia, impianto basso e retroposto delle orecchie con elice ispessito, pterigium colli e attaccatura posteriore dei capelli (4,6).
- Nei **lattanti** (1 mese - 1 anno): macrocefalia relativa, fronte alta e prominente, ptosi o palpebre ispessite e socchiuse, naso corto e largo con radice depressa (4). (Fig.1)
- Nella **tarda infanzia** (5-13 anni): il volto diventa tondeggiante, poco espressivo, con aspetto ipototonico o miopatico. Assume una forma più triangolare con sopracciglia e ciglia sparse o assenti e capelli che possono assumere un aspetto riccio e lanoso (4,6). (Fig. 1)
- Durante l'**adolescenza** (13-21 anni) e nel **giovane adulto** : radice nasale stretta e prominente con base ampia, collo è più lungo con pterigium colli o muscolo trapezio accentuato (4,6).
- Nell'**età adulta**: pieghe nasolabiali prominenti mentre la pelle diventa sottile e trasparente. I soggetti adulti di sesso maschile hanno una circonferenza cranica media di

56,4 cm, mentre quelli di sesso femminile 54,9 cm. Tendono ad avere spesso un'iride di colore azzurro o blu-verde, indipendentemente da quello che si potrebbe aspettare sulla base della genetica familiare. I capelli possono essere sottili e radi oppure ricci, spessi e lanosi (4). (Fig.1)

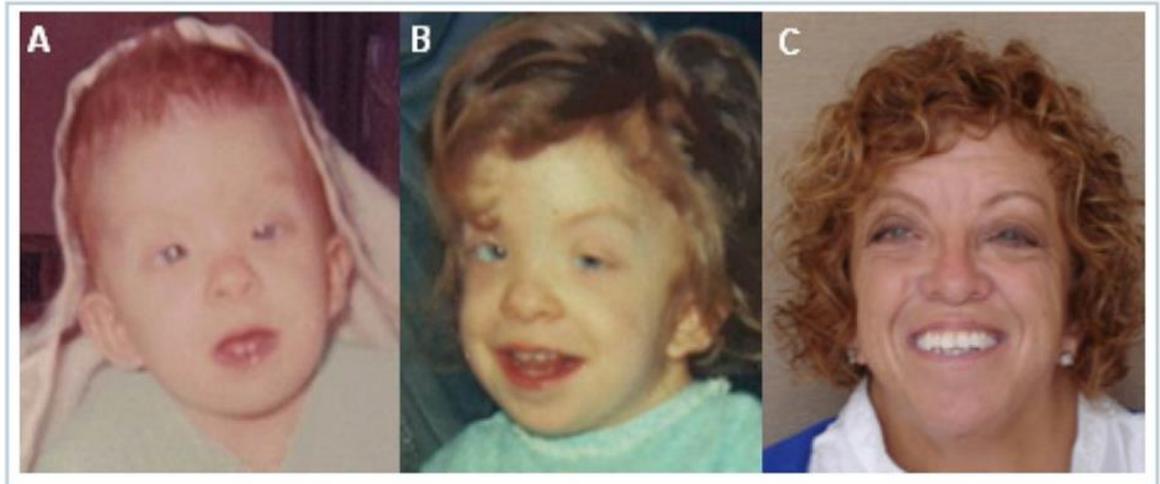


Figura 1: Femmina con Sindr. Noonan vista all'età di 4 mesi (A), 4 anni (B) e all'età adulta (C) [Stevenson et al. Noonan syndrome, *BMJ Best Practice* 2018]

Infine, in uno studio condotto da Allanson et al. nel 2010, si è messo in evidenza la difficoltà nel correlare i vari tipi di dismorfismi facciali con il relativo genotipo perché ciascuna mutazione genetica può dare origine alla comparsa di fenotipi classici o atipici.

In particolare, dallo studio è emerso che da un lato sono evidenziabili delle caratteristiche fenotipiche più frequentemente associate ad una mutazione piuttosto che ad un'altra: ad esempio, un fenotipo con volto tondeggiante, ciglia e sopracciglia rade, capelli ricci o radi ed eritema cutaneo è spesso associato a mutazione di *SOS1*, la presenza di loose anagen hair è spesso correlata alla mutazione *SHOC2*, l'asimmetria cranica o facciale è più indicativa di un coinvolgimento di *RAF1* e infine caratteristiche facciali più grossolane con una naso pronunciato sono spesso legate a mutazione di *KRAS*.

Dall'altra parte però, proprio per la presenza di fenotipi tipici ma anche atipici correlati alla stessa mutazione, lo studio si conclude affermando come sia in realtà più utile fare affidamento sul riscontro di altre caratteristiche (ad esempio: l'entità della bassa statura, tipo di malformazione cardiaca presente e la presenza o meno di ritardo cognitivo) per orientare una iniziale diagnosi genotipica. (7)

Fotografie (Figg. 2-4) di bambini affetti da sindrome di Noonan ricavate da una Review Article di Turner Anne M., Noonan Syndrome, Journal of paediatrics and Child Health, 2014 (8):

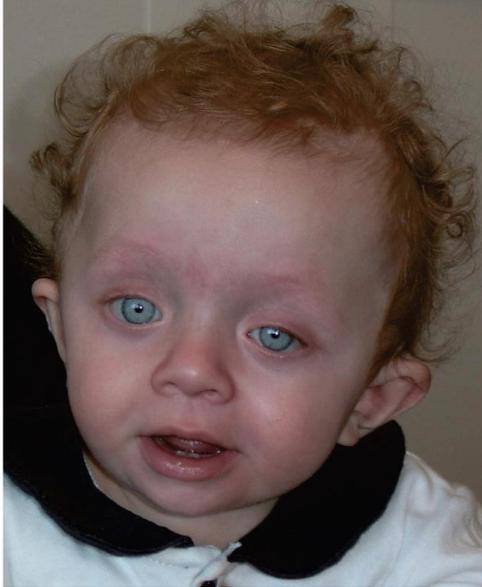


Figura 2: Bambina con mutazione PTPN11: sono presenti orecchie con impianto basso, retroposte e con elice ispessito, fronte alta, ipertelorismo, radice nasale depressa con naso a sella e occhi azzurri.



Figura 3: Bambina con mutazione di KRAS: sono presenti strabismo convergente, ipertelorismo, naso pronunciato con base ampia, radice nasale stretta e prominente, filtro naso labiale allungato con punte del vermiglio superiore accentuate, fronte ampia e prominente.



Figura 4: Bambino con mutazione di RAF1: evidenza di fronte alta, ipertelorismo, impianto basso e retroposto delle orecchie e collo corto.

2) Alterazioni muscolo-scheletriche.

Di tipico riscontro sono:

- Deformità toraciche con petto carenato superiormente e petto scavato inferiormente (70%-95% dei casi) (4). (Figg. 5, 6)
- Ampio torace con capezzoli molto distanziati. Durante l'infanzia, generalmente la parte superiore del torace è allungata con impianto basso dei capezzoli, le spalle sono arrotondate (dovuto probabilmente alla postura ipotonica) e collegate al collo da una piega cutanea (pterigium colli) che persiste anche in età adulta (4,6).
- Il 50% dei casi presenta cubito valgo (cioè ad arto superiore esteso, l'asse del braccio forma con quello dell'avambraccio un angolo superiore a 15°). In circa un terzo dei bambini si osserva clinobrachidattilia e nel 30% iperestensibilità articolare (4).
- Anomalie scheletriche sono meno comuni: piede equino-varo, sinostosi radio-ulnare, scoliosi (15%) (Fig. 6), scapole alate, contratture articolari, osteopenia e dolori ricorrenti per microfratture o turnover osseo sono possibili (4,9).
- Ipotonia generalizzata è spesso frequente nella prima infanzia e tende a diminuire con l'età (6,10).
- Debolezza muscolare è comune ed è un fattore contribuyente allo sviluppo di osteopenia ed osteoporosi (10).



Figura 5: Evidenza di petto carenato superiormente ed escavato inferiormente. (Stevenson et al. Noonan syndrome, *BMJ Best Practice* 2018. Turner Anne M., Noonan Syndrome, *Journal of paediatrics and Child Health*, 2014.)



Figura 6: Petto carenato ed escavato con scoliosi. (Reinker, Stevenson et al. *Orthopaedic Conditions in RAS/MAPK related disorders*, *J Pediatr Orthop*.)

3) Anomalie di pigmentazione cutanea.

Di tipico riscontro sono:

- Nevi pigmentati (25% dei casi)
- Macchie café-au-lait (10%)
- Lentiggini (3%)
- Ulerythema ophryogenes (cioè cheratosi pilare rubra atrofica del viso) è presente nel 14% dei casi e causa la formazione di papule cheratotiche infiammatorie sul viso, seguite da cicatrici, atrofia e alopecia. Ciò infatti porta alla perdita delle sopracciglia e alla difficoltosa crescita della barba in età adulta (4,6).

4) Difetti cardiaci congeniti

La sindrome di Noonan è la seconda condizione patologica, dopo la trisomia 21, che risulta essere più frequentemente associata a difetti cardiaci congeniti (riscontrati in circa l'80% dei pazienti) (11). Tra questi di più frequente riscontro sono:

- Stenosi e/o displasia della valvola polmonare (50-60%).

La stenosi della valvola polmonare si riscontra in forma lieve nel 60% dei casi, in forma moderata nel 10% e in forma grave nel 30%. I pazienti con stenosi di grado lieve necessitano solamente di controlli periodici tendendo presente però che circa la metà di loro può presentare in contemporanea anche difetti settali atriali di tipo ostium secundum. Al contrario, quelli con stenosi moderata o severa spesso hanno lembi valvolari displastici con fusione commissurale e lembi ispessiti e dunque risulta necessario un intervento di valvuloplastica percutanea oppure, in caso di fallimento o di impossibilità di esecuzione, di valvulotomia che sembra avere maggiore possibilità di successo in pazienti Noonan (11).

- Cardiomiopatia ipertrofica (20%) che può essere lieve o severa e può svilupparsi nel periodo prenatale, alla nascita o durante l'infanzia (4).

A tal proposito un recentissimo studio retrospettivo del 2021 ha dimostrato l'importanza del riscontro di cardiomiopatia ipertrofica all'ecografia fetale nella diagnosi prenatale di RASopatia. È infatti emerso che su 10 feti positivi per riscontro ecografico di cardiomiopatia ipertrofica (aventi cariotipo o microarray cromosomico negativi), 6 sono poi risultati positivi al test genetico prenatale per RASopatie (12).

Inoltre circa il 25% dei pazienti muore per insufficienza cardiaca nel primo anno di vita anche se comunque la percentuale di morte improvvisa rimane più bassa rispetto a quella per cardiomiopatia ipertrofica familiare (1).

- Difetti settali atriali di tipo ostium secundum (6-10%)
- Difetti settali ventricolari (5%)
- Dotto arterioso persistente (3%)
- Altre condizioni di più raro riscontro sono: stenosi della valvola mitrale (6%), coartazione dell'aorta (9%), canali atrio-ventricolari parziali, aneurismi di arterie coronarie, carotidee e di aorta. (11)

Data l'elevata incidenza di anomalie cardiache congenite in bambini affetti da sindrome di Noonan risultano fondamentali l'esecuzione di elettrocardiogramma ed ecocardiografia per la diagnosi e il successivo follow-up della patologia.

Infatti, l'ECG spesso mostra ampi complessi QRS con alterato rapporto R/S nelle derivazioni precordiali sinistre, deviazione assiale sinistra e onde Q giganti. (1)

5) Difficoltà nell'alimentazione

Circa il 77% dei bambini ha difficoltà nell'alimentazione sin dall'epoca neonatale e ciò consiste in: suzione difficoltosa con tempi di allattamento prolungati, vomito ricorrente o marcata difficoltà nell'alimentazione che richiede il posizionamento di un sondino nasogastrico con, dunque, nutrizione enterale per due o più settimane. (4)

Questa condizione di alimentazione difficoltosa è spesso dovuta alla ipotonia e alla mancanza di coordinazione della muscolatura oro-faringea, ma sono stati descritti anche casi dovuti alla immatura motilità intestinale e al ritardato sviluppo del sistema nervoso mioenterico. (4)

Si tratta di una alterazione autolimitante che tende a risolversi spontaneamente dai 18 mesi di età, con quindi un miglioramento della capacità del bambino di alimentarsi. È però da monitorare strettamente perché porta nel 40% dei neonati ad un ridotto aumento di peso e lunghezza SDS all'età di 1 anno rispetto ai bambini senza problemi di alimentazione (4,13).

In uno studio retrospettivo del 2020 svolto da Draaisma et al. e pubblicato su European Journal of Pediatrics sono stati presi in carico 108 pazienti affetti da sindrome di Noonan geneticamente confermata. È emerso che tra questi 108 pazienti, 56 (52%) avevano avuto

un esordio precoce (cioè prima dell'anno di vita) di alimentazione difficoltosa di cui 23 pazienti (41%) avevano continuato una dieta per os, mentre 33 (59%) avevano necessitato del sondino naso-gastrico.

Dei 56 pazienti iniziali 16 (di cui 12 erano inizialmente sondino-dipendenti) hanno continuato ad avere difficoltà nell'alimentazione dopo il primo anno di vita, a 2 anni 7 pazienti (di cui 6 erano sondino-dipendenti) avevano ancora alimentazione difficoltosa e a 4 anni solo 3 (di cui 2 erano sondino-dipendenti) avevano ancora problemi alimentari, ciò a dimostrare come la prevalenza di questo disturbo tenda a diminuire in maniera importante con l'età e come tenda a persistere soprattutto nei bambini che hanno fatto uso di sondino naso-gastrico.

È inoltre emerso come la prevalenza di questo disturbo sia più frequente in pazienti Noonan senza mutazione di PTPN11 o SOS1.

Infine, solo 1 bambino su 7 matura questo problema dopo l'anno di età e ciò spesso è legato all'insorgenza di infezioni, comorbidità o complicanze post-operatorie (13).

6) Apparato genito-urinario

In circa il 10% dei pazienti sono state riscontrate malformazioni renali, che rimangono dunque delle anomalie non di frequente riscontro nella popolazione Noonan.

Tra le malformazioni renali più comuni riscontriamo: stenosi ureterale distale, ipoplasia renale, agenesia o ectopia renale unilaterale e doppio distretto renale (4).

Comorbidità frequente è il criptorchidismo mono o bilaterale che si riscontra in 60%-69% dei bambini maschi ed è spesso associato a pubertà ritardata e ritardo dello spurt puberale (4).

Per quanto riguarda la fertilità nei pazienti Noonan, è stata descritta nei maschi una disfunzione gonadica con deficit di spermatogenesi, a differenza delle femmine che invece non hanno alcun problema in tale ambito (14).

In particolare, in uno studio retrospettivo svolto da Moniez et al. e pubblicato nel 2018 su *European Journal of Endocrinology* è emerso che i maschi affetti da sindrome di Noonan risultano avere:

da una parte, dei livelli di testosterone normali e quindi una adeguata funzionalità delle cellule di Leydig, dall'altra tendono però ad avere dei livelli molto ridotti di ormone anti-Mulleriano (AMH) e di inibina B rispetto alla popolazione generale. Ciò sta proprio ad

evidenziare una disfunzione primaria delle cellule di Sertoli che porta ad un difetto nella proliferazione, nel differenziamento degli spermatogoni e ad una alterazione a carico della barriera emato-testicolare, di conseguenza ad infertilità.

Questi bassi livelli di AMH e inibina B sono stati riscontrati soprattutto in pazienti con mutazione di PTPN11 (e secondariamente di RAF1) senza alcuna differenza di concentrazione tra i pazienti con e senza criptorchidismo, ciò a suggerire come ci sia un difetto intrinseco a carico di queste cellule.

PTPN11, infatti, è espresso nelle cellule germinali immature e nelle cellule del Sertoli dalla nascita all'età adulta ed è responsabile della codifica della proteina SHP2 che ha un ruolo fondamentale nella funzione gonadica. L'attivazione costitutiva di SHP2 e del pathway RAS/ERK dovuta a questa mutazione gain-of-function di PTPN11 genera una alterazione nella funzionalità delle cellule del Sertoli che invece necessiterebbero di una fine regolazione di questi due sistemi.

Questo stesso gene ha anche un impatto sulla crescita del bambino, infatti pazienti PTPN11 mutati tendono ad essere molto più bassi rispetto a quelli con mutazione di SOS1 proprio in virtù dell'aumento del segnale di down-regolazione dei recettori per il GH dato dalla iper-attivazione di SHP2 (14).

Inoltre, dallo stesso studio è emerso che i bambini Noonan trattati con ormone della crescita avevano dei livelli più bassi di AMH e inibina B rispetto a quelli non trattati. Ciò a dimostrazione del fatto che i bambini più bassi tendono ad avere una disfunzione testicolare più severa (14).

7) Disordini del sistema linfatico.

Si tratta di una comorbidità di non frequente riscontro, che colpisce infatti circa il 20% dei pazienti Noonan (4).

Dal punto di vista eziologico, deriva dalla insorgenza di displasia, ipoplasia o aplasia dei vasi linfatici che di conseguenza portano a varie manifestazioni fenotipiche in epoca pre e post-natale:

- Durante la **vita intra-uterina** si registra: aumento della traslucenza nucale, aumento della plica nucale, igroma cistico (evidenziabile precocemente, prima della 14 settimana di gestazione, che tende a regredire per portare poi all'insorgenza di pterigium colli dopo la nascita), idrope fetale, ascite e versamento pleurico (6,12).

Il riscontro di una o più di queste anomalie sopra elencate all'ecografia fetale, pone il sospetto per l'esecuzione in primis di cariotipo e Array-CGH per escludere anomalie cromosomiche e successivamente, qualora queste indagini fossero risultate negative, l'esecuzione di un test genetico prenatale con NGS per RASopatie (12).

- Alla **nascita**: linfedema del dorso delle mani o dei piedi che contribuisce a dare un aumentato peso alla nascita e che tende poi a risolversi durante l'infanzia (4).
- Durante l'**infanzia** può manifestarsi chilotorace spontaneo (6).

Inoltre, il chilotorace può presentarsi in circa il 10% dei pazienti che si sottopongono a cardiocirurgia ma non sembra essere correlato ad una maggiore degenza ospedaliera e la terapia si basa sempre sul drenaggio del versamento. Sono stati registrati anche casi di versamento chiloso pericardico anche se di più raro riscontro (11).

Recentemente è stato poi condotto uno studio di linfangiografia in 10 pazienti Noonan con difetti cardiaci congeniti e chilotorace. Da questo è emerso che tra loro vi era una alta prevalenza di anomalie del dotto toracico, flusso retrogrado intercostale e linfangectasia polmonare. Quindi, risulta essere poco probabile che l'insorgenza di chilotorace post-operatorio sia causato sempre da un danno diretto al dotto toracico derivante dall'intervento chirurgico (15).

- Condizioni più rare che possono manifestarsi ad ogni età: linfangectasia intestinale o polmonare ed edema a carico di scroto o pene (4).

Vi sono poi delle comorbidity derivanti dalla presenza di edema fetale che causa una anomala migrazione di tessuti o un alterato posizionamento degli organi. Tra queste rientrano: criptorchidismo, impianto basso e retroposto delle orecchie, ipertelorismo, down-slanting palpebrale e capezzoli ben distanziati (6).

8) Deficit della coagulazione.

Difetti della coagulazione sono presenti in 30%-65% dei pazienti Noonan ma quadri di emorragia severa sono stati riscontrati in solo il 3% degli affetti (4).

Infatti, i sintomi associati sono generalmente lievi e caratterizzati da: comparsa di ecchimosi, epistassi, menorragia o sanguinamenti più importanti durante procedure chirurgiche (16).

Sono stati riscontrati:

- Deficit di fattori della coagulazione (isolati o combinati):

Il 25% dei pazienti presenta un deficit parziale di fattore XI della coagulazione ma l'entità dei sintomi correlati non dipende dalla gravità del suo deficit.

Altre carenze riscontrate sono a carico del fattore XII e VIII. In particolare, il deficit del fattore XII può prolungare l'aPTT ma ciò non si traduce, dal punto di vista clinico, in un aumento del rischio emorragico. Invece bassi livelli di fattore VIII possono essere presenti insieme alla malattia di von Willebrand.

Di più raro riscontro sono i deficit dei fattori IX e II.

- Trombocitopenia:

si tratta di una anomalia ad eziologia multifattoriale legata da una parte, alla riduzione dei megacariociti midollari che causa dunque un difetto di produzione di piastrine, dall'altra alla splenomegalia (riscontrabile in massimo il 52% dei pazienti e che, se presente, potrebbe essere, insieme alla epatomegalia, un indicatore di mielodisplasia (4)) che potrebbe causarne un loro sequestro dal circolo. Si tratta dunque di una alterazione da monitorare perché potrebbe essere indice di insorgenza di un disordine mieloproliferativo (soprattutto se presenti anche leucocitosi, monocitosi ed epatosplenomegalia) o addirittura di leucemia mielomonocitica giovanile (JMML) che però sembra avere una buona prognosi in questi pazienti

- Disfunzione piastrinica:

a tal proposito è stato condotto uno studio incentrato sull'analisi dell'attivazione piastrinica in pazienti con sindrome di Noonan PTPN11 mutata. In particolare, si sono utilizzati dei topi recanti la mutazione PTPN11 e delle piastrine prelevate dai pazienti stessi. Da questo studio è emerso che pazienti con mutazione PTPN11 la quale porta alla mutazione gain-of-function di SHP2 hanno una riduzione significativa di aggregazione piastrinica e quindi anche una riduzione di formazione e di crescita del trombo a seguito di shear stress di un vaso (17).

- Allungamento del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT).

Alla luce di tutto ciò che è stato descritto, si deduce come in realtà non ci sia una correlazione diretta tra l'entità dell'anomalia riscontrata ai test coagulativi di screening e l'effettiva manifestazione clinica. Quindi, i test coagulativi non hanno un valore di predizione del rischio di sanguinamento nei pazienti Noonan (6,18).

Infatti, in uno studio eseguito su 39 pazienti Noonan, solo il 40% aveva avuto episodi di diatesi emorragica a fronte di un più del 90% di pazienti con evidenza di alterazioni coagulative e/o di disfunzione piastrinica. Lo studio si conclude quindi raccomandando l'esecuzione di test coagulativi di screening in pazienti affetti da sindrome di Noonan con la finalità non di predire il rischio emorragico ma di diagnosticare il tipo di difetto coagulativo e/o piastrinico così da intervenire adeguatamente in caso di sanguinamenti importanti o di interventi chirurgici programmati (19).

9) Malattie autoimmuni

Sono stati riportati casi sporadici di disordini autoimmuni nei pazienti affetti da RASopatie (sindrome di Noonan e Noonan-related disorders). Ciò a dimostrazione di come diversi geni appartenenti al pathway RAS/MAPK siano coinvolti nella regolazione immunitaria.

In particolare, in uno studio effettuato su 42 pazienti affetti da RASopatia (37 affetti da sindrome di Noonan) il 52% era positivo alla presenza di autoanticorpi e il 14% presentava anche manifestazioni cliniche compatibili con patologie autoimmuni. Quelle di più frequente riscontro sono risultate essere: lupus eritematoso sistemico, tiroidite autoimmune, celiachia, sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi, epatite autoimmune e vitiligine.

È dunque necessario tenere presente questa possibile comorbidità e considerare, a seconda del riscontro clinico, l'esecuzione di eventuali test diagnostici. (4,20)

10) Deficit neuro-sensoriali

Di maggior riscontro sono risultano essere:

- Ipoacusia:

15-40% dei bambini presenta ipoacusia di trasmissione secondaria alle frequenti otiti medie cui vanno incontro. Dunque, un trattamento da subito più aggressivo contro queste otiti potrebbe prevenire l'insorgenza di ipoacusia.

L'ipoacusia neurosensoriale è meno frequente (3%) ma, quando presente, in un 10% dei casi causa compromissione a carico delle basse frequenze, in un 25% invece delle alte frequenze. (4,6)

- Disturbi oftalmologici:

I pazienti affetti da sindrome di Noonan presentano una ampia varietà di disturbi oftalmologici.

Quelli di più frequente riscontro sono:

ipertelorismo (74%), difetti di rifrazione nel 61% dei casi (astigmatismo, miopia, ipermetropia), strabismo (40%), disturbi a carico della camera anteriore nel 66% dei casi (nervi corneali prominenti, distrofia stromale anteriore e panuveite) e ambliopia (33%).
(21)

Meno frequenti sono: cataratta, anomalia del fondo (ipoplasia disco ottico, coloboma, nervi mielinizzati e druse della testa del nervo ottico) e ostruzione del dotto nasolacrimale.

In relazione alla mutazione genetica acquisita, in uno studio effettuato su 25 pazienti, si è riscontrato che: i pazienti con mutazione di SOS1 e di PTPN11 risultano essere più frequentemente associati al riscontro di nervi corneali prominenti, mentre i casi BRAF mutati tendono ad avere spesso riduzione dell'acuità visiva e ipoplasia del nervo ottico.
(22)

Dunque, proprio a causa delle frequenti comorbidità di tipo oftalmologico è necessario eseguire una visita oculistica nel primo anno di vita per eventuale diagnosi a cui seguirà un attento follow-up. (22)

Per quanto riguarda il trattamento di questi disturbi, si è visto che circa il 50% dei pazienti generalmente richiede una terapia non chirurgica (prescrizione di occhiali o terapia occlusiva per ambliopia), invece meno del 20% si è sottoposto a chirurgia correttiva per strabismo o ptosi palpebrale o ostruzione dotto nasolacrimale.(21)

11) Aspetti neurologici, cognitivi e comportamentali

Gli aspetti neurologici, cognitivi e comportamentali sono estremamente variabili e ancora oggi non del tutto noti.

In particolare, è evidente una aumentata incidenza di disabilità cognitive e difficoltà di apprendimento oltre che una aumentata incidenza di anomalie a carico del sistema nervoso con svariati problemi neurologici che contribuiscono poi all'insorgenza di ipotonia, ipoacusia, difetti oculari, crisi epilettiche ricorrenti (10% dei casi con età media di inizio pari a 11 anni) e neuropatia periferica (evenienza rara, 3% dei casi). (4,16)

In maniera più dettagliata:

- Innanzitutto, questi bambini tendono ad avere un ritardo nell'acquisizione delle tappe dello sviluppo psico-motorio: acquisiscono la stazione seduta a 10 mesi, iniziano a camminare a 21 mesi e a formulare frasi di due parole a 31 mesi. Inoltre, in circa il 10% dei casi, sono stati descritti attacchi di crisi epilettiche con esordio a circa 11 anni di età.
- La maggior parte dei bambini Noonan presenta un'intelligenza nella norma o addirittura superiore alla norma ma circa il 33% dei pazienti presenta un Mild Cognitive Impairment, con quindi un QI generale che varia da 64 a 127.

In realtà si è visto che anche tra i pazienti con intelligenza nella norma c'è un 10-40% che richiede un supporto scolastico e comunque anche loro generalmente hanno un QI che risulta essere in difetto di circa 10 punti rispetto a quello dei familiari non affetti. (16)

Si può, in generale, affermare che i loro punti di forza sono rappresentati da: comprensione verbale, ragionamento astratto, consapevolezza e giudizio sociale. Invece tra i punti di debolezza si ritrovano: difficoltà nell'organizzazione delle informazioni percettive, mancanza di capacità di pianificazione e di conoscenza spaziale. (4)

- Circa il 25% ha difficoltà nell'apprendimento con, in particolare, deficit visuo-costruttivi, riduzione delle capacità verbali rispetto a quelle non verbali e disturbo del linguaggio che può condizionare anche difficoltà nella lettura. (1,4)

In merito al deficit di capacità soprattutto verbali, in uno studio eseguito con lo scopo di indagare gli aspetti psicopatologici, la cognizione sociale, la capacità di adattamento e quindi la qualità di vita dei pazienti affetti da sindrome di Noonan è emerso che 6 pazienti su 10 (con età da 16 anni in su) avevano difficoltà nel riconoscimento delle emozioni e alessitimia (difficoltà nell'esprimere verbalmente le proprie emozioni e quelle altrui). Inoltre, in alcuni pazienti si sono anche evidenziati problemi di ansia e depressione. (23)

Rimanendo sempre all'interno dell'ambito neuro-psichiatrico si è riscontrata una incidenza più alta di ADHD (Attention Deficit Hyperactivity Disorder) tra i maschi affetti da sindrome di Noonan (50%) piuttosto che tra le femmine (8%). (24)

Invece riguardo ai disturbi del linguaggio, in uno studio condotto su 37 pazienti è emerso come il 78% fosse affetto da questo tipo di deficit che colpiva soprattutto l'area di produzione grammaticale rispetto a quella lessicale. (25)

- Circa il 50% dei pazienti ha disturbi della coordinazione e infatti tendono a presentarsi goffi, impacciati e facilmente irritabili.

- Sono stati registrati anche casi di compromissione delle capacità mnemoniche: in particolare, in uno studio condotto su 29 pazienti con diagnosi di sindrome di Noonan si sono evidenziati deficit a carico della memoria a lungo termine. Infatti, il sistema RAS/MAPK risulta avere un ruolo essenziale nella plasticità sinaptica e in particolare nel potenziamento a lungo termine che rappresenta un fenomeno chiave per l'immagazzinamento della memoria a lungo termine all'interno di ippocampo, amigdala e regioni della neocorteccia.

In questo studio è emerso che questi bambini tendono ad avere una capacità di libero richiamo verbale (che fa capo ai networks prefrontali-ippocampali) migliore rispetto alla memoria di riconoscimento visivo e spaziale che ha sede nelle regioni corticali temporali.

Invece, per quanto riguarda la memoria a breve termine, i pazienti hanno una performance nettamente migliore nell'ambito della memoria verbale piuttosto che nella memoria visiva o nella working memory.

Si sono poi evidenziate alcune piccole differenze fenotipiche in base al tipo di mutazione acquisita. Ad esempio, i pazienti con mutazioni di p.N308D e p.N308S appartenenti al gene PTPN11 sembrano però avere una funzionalità mnemonica praticamente intatta rispetto a quelli che mutazione BRAF che invece hanno dimostrato avere il più basso valore di General Memory Index score. Ciò dimostra come vi sia un ampio spettro di entità di deficit mnemonici che differiscono anche in base alla mutazione genetica acquisita. (24)

- Vere e proprie anomalie a carico del sistema nervoso centrale sono evenienza rare. Generalmente si può riscontrare idrocefalo e malformazione di Arnold-Chiari di tipo I caratterizzata da discesa delle tonsille cerebellari attraverso il forame magno all'interno del canale spinale con conseguente compressione di cervelletto, midollo spinale e deflusso del liquor ostacolato. (16)

Invece è più frequente il riscontro di anomalie cerebrovascolari come malformazioni arterovenose, aneurismi, ipoplasia dei vasi posteriori e moyamoya (condizione patologica caratterizzata da stenosi progressiva della porzione distale intracerebrale delle arterie carotidi interne che porta allo sviluppo di una rete vascolare secondaria con aspetto a "nube di fumo di sigaretta"). (1)

12) Predisposizione allo sviluppo di neoplasie

I pazienti affetti da sindrome di Noonan hanno una maggiore tendenza a sviluppare tumori benigni (ad esempio: lesioni a cellule giganti a carico dell'osso mandibolare e

tumori a cellule granulari) e maligni sia solidi (soprattutto neuroblastoma e rabdomiosarcoma) sia soprattutto ematologici (leucemia giovanile mielomonocitica, leucemia acuta linfoblastica a cellule B, leucemia mieloide acuta). (26,27)

In uno studio coinvolgente 297 pazienti Noonan con età media di 18 anni e mutazione di PTPN11, è stato calcolato un rischio aumentato di 3-5 volte di sviluppare tumori rispetto alla popolazione generale. È emerso infatti che questi pazienti hanno un rischio cumulativo pari al 23% di sviluppare una neoplasia entro i 55 anni rispetto alla popolazione generale, con una netta prevalenza per i tumori ematologici. Si stima, dunque, che circa il 10% sia affetto da un disordine mieloproliferativo generalmente autolimitante e una minore percentuale sviluppa poi leucemia mielomonocitica giovanile (JMML). (27)

In particolare, la mutazione 731Ile a carico del gene PTPN11 è stata riscontrata sia in circa la metà dei bambini Noonan affetti da leucemia mielomonocitica giovanile (JMML) (che però, anche se ha un esordio più precoce, tende ad avere una presentazione clinica più lieve con leucocitosi, trombocitopenia, epatosplenomegalia e una remissione spontanea, con quindi una prognosi migliore rispetto alla JMML sporadica), sia, anche se più raramente, in bambini affetti da leucemia acuta linfoblastica. (4,6) Tuttavia sono stati registrati anche pochi casi di disordine mieloproliferativo aggressivo di tipo monoclonale che ha portato alla morte alcuni neonati o bambini.

Dunque, in virtù dell'aumentata incidenza di queste neoplasie ematologiche in pazienti recanti la mutazione PTPN11, si può affermare che il guadagno di funzione della proteina SHP-2, codificata appunto dalla mutazione gain-of-function del gene PTPN11, sia correlato con i processi di espansione del clone leucemico e con la progressione a forme dotate di elevata malignità. (26,27)

Per quanto riguarda invece l'aumentata incidenza di tumori solidi, sono stati riscontrati casi di rabdomiosarcoma embrionale a carico di duodeno, vagina, addome, vescica, uraco e occhio, di cui 3 casi recavano la mutazione germline di SOS1.

Sono stati riportati anche casi di neuroblastoma, astrocitoma pilocitico, 1 caso di RAF1 mutato con tumore a cellule giganti e sempre in 3 pazienti con mutazione germline di SOS1, casi di tumore testicolare a cellule del Sertoli e tumori della pelle a cellule granulari. (28)

Infine, sono stati anche registrati 3 casi di tumori gliali di cui 2 recavano la mutazione germline di PTPN11. (1)

Nonostante, però, la provata aumentata incidenza di neoplasie in questi pazienti, attualmente non c'è in vigore un programma di sorveglianza preciso proprio in virtù dei vari siti anatomici potenzialmente coinvolti e delle varie età di possibile insorgenza di queste neoplasie. (27)

1.2 Crescita

1.2.1 Fisiologia della crescita corporea

La crescita corporea è un processo continuo, ma non lineare, che inizia al momento del concepimento e si conclude con la maturazione sessuale di ciascun individuo. Durante la vita fetale la crescita è influenzata da fattori genetici, fattori materni, livello di ossigenazione e nutrizione del feto. Dopo la nascita invece, è influenzata da fattori ormonali, nutrizionale e ambientali.

In particolare, la velocità di crescita staturale (VCS) è molto rapida nel primo anno di vita (si verifica un aumento di circa il 50% rispetto alla nascita), durante il secondo anno la VCS è di circa 1 cm/mese per poi ridursi progressivamente dopo il secondo anno. La crescita media procede in modo quasi costante (6-8 cm/anno) fino al periodo prepuberale dove rallenta per poi nuovamente accelerare durante lo spurt puberale.

Tra i fattori ormonali fondamentali per la crescita post-natale si riscontrano:

- GH che agisce sia direttamente (effetto lipolitico) sia indirettamente tramite la stimolazione di secrezione epatica di IGF-I (stimola la sintesi proteica soprattutto nelle cartilagini di accrescimento e nelle masse muscolari).
- Insulina e glucocorticoidi che, influenzando il metabolismo lipidico, proteico e glucidico, hanno un effetto permissivo sull'azione anabolica del GH.
- Ormoni tiroidei che stimolano il turnover osseo.
- Estrogeni che sono responsabili della maturazione delle cartilagini epifisarie in entrambi i sessi.

Dunque, per valutare l'andamento della crescita fondamentali sono:

- Misurazione dei parametri auxologici (soprattutto peso, altezza, circonferenza cranica) e calcolo del relativo target genetico di statura. Si considera fisiologica una altezza tra 10° e 90° centile e parafisiologica quella tra 3°-10° centile e tra 90°-97° centile).

- Rilevare età cronologica, età ossea (valutabile con lo studio di una radiografia del carpo mediante il metodo di Greulich-Pyle basato sul confronto del radiogramma in esame con gli standard illustrati nel testo, o mediante il metodo a punteggio osso-specifico di Tanner Whitehouse che risulta essere più preciso) e i loro rapporti.
- Eventuali indagini ormonali per lo studio della dinamica secretoria del GH, valutazione di IGF-I e delle sue proteine di trasporto (IGFBP-3), valutazione della funzione tiroidea, gonadica ed eventualmente ipofisaria.

Alla luce di quanto precisato, si parla di bassa statura o ipostaturalità quando si ha:

- Statura inferiore a 3° centile in rapporto all'età e al sesso ovvero inferiore a -2 SDS
- Velocità di crescita/anno inferiore a -1 SDS
- Statura inferiore a -2 SDS o -2,5 SDS rispetto al proprio target genetico.

1.2.2 Ipostaturalità nella sindrome di Noonan:

Il 50%-70% dei bambini Noonan è affetto da ipostaturalità.

In realtà questi bambini tendono ad avere parametri auxologici (peso e lunghezza) alla nascita generalmente nella norma e senza differenze di sesso: in particolare Ranke et al. avevano riscontrato in 109 casi nati tra la 38° e la 42° settimana di gestazione, un peso medio alla nascita di $3182 \pm 1502\text{g}$ e una lunghezza media di $51 \pm 1,9\text{cm}$ per i maschi, invece per le femmine un peso medio di $3219 \pm 745\text{g}$ e una lunghezza media di $51,1 \pm 2,4\text{cm}$. (29)

Però, sin dai primi tre mesi di vita questi bambini subiscono una decelerazione di altezza e peso (quest'ultimo dovuto anche ai problemi legati alla alimentazione, condizione di frequente riscontro soprattutto nei neonati). In particolare, tendono ad avere una rapida perdita staturale pari a 1-1,5 DS nel primo anno di vita e dopo i 2-4 anni di età tendono a mantenere fino alla pubertà (che avviene in media 12 anni per i maschi e 10 anni per le femmine (29)) valori paralleli al terzo percentile per poi rimanere al di sotto del range di normalità. (Fig.7)

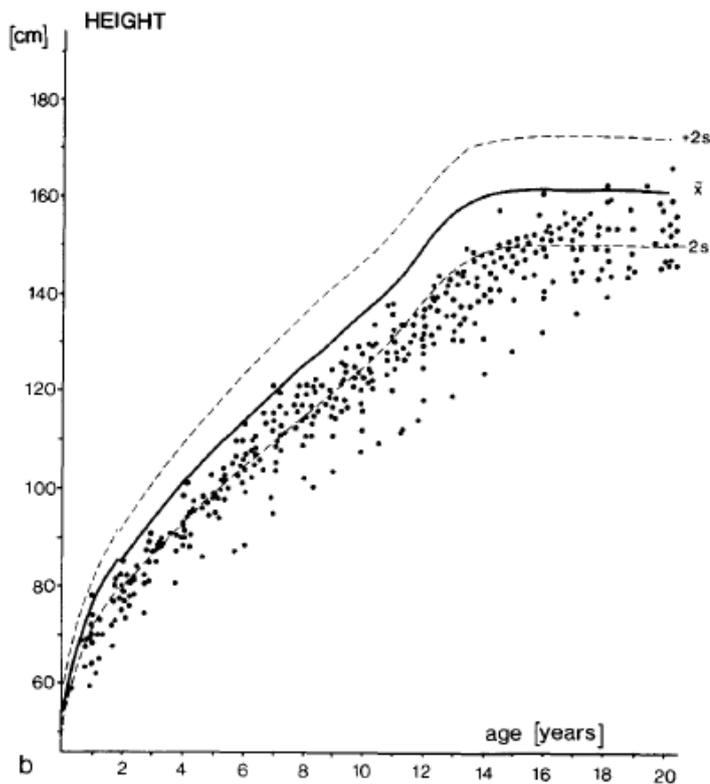
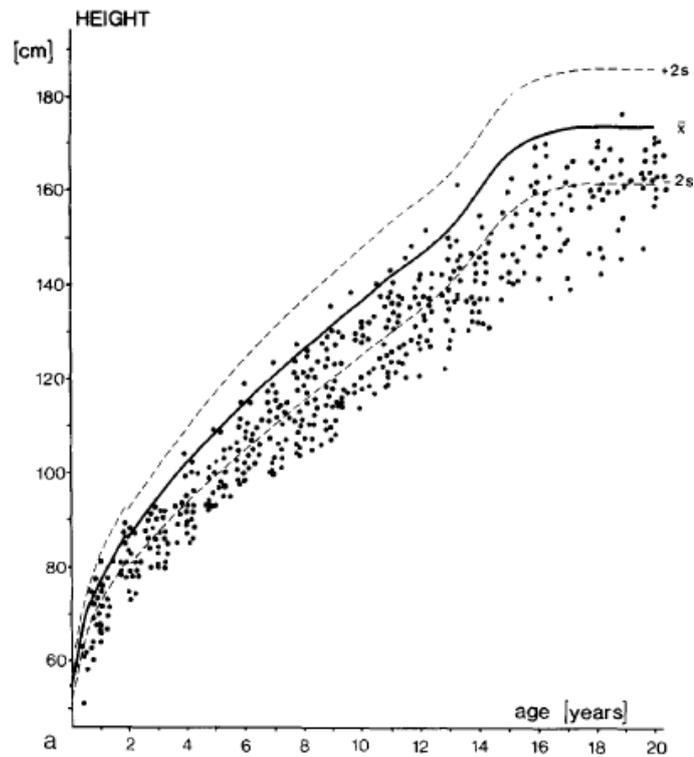


Figura 7: Andamento dell'altezza correlata all'età in 144 pazienti con sindrome di Noonan rispetto alla popolazione generale. **a** maschi ($n=89$), **b** femmine ($n=55$). (29)

Analogamente pubertà ed età ossea media generalmente hanno un ritardo di circa 2 anni e lo spurt puberale (che dipende a sua volta dalla interazione di GH e ormoni sessuali) risulta essere ritardato o comunque attenuato. (Fig. 8) (4,6,16,30)

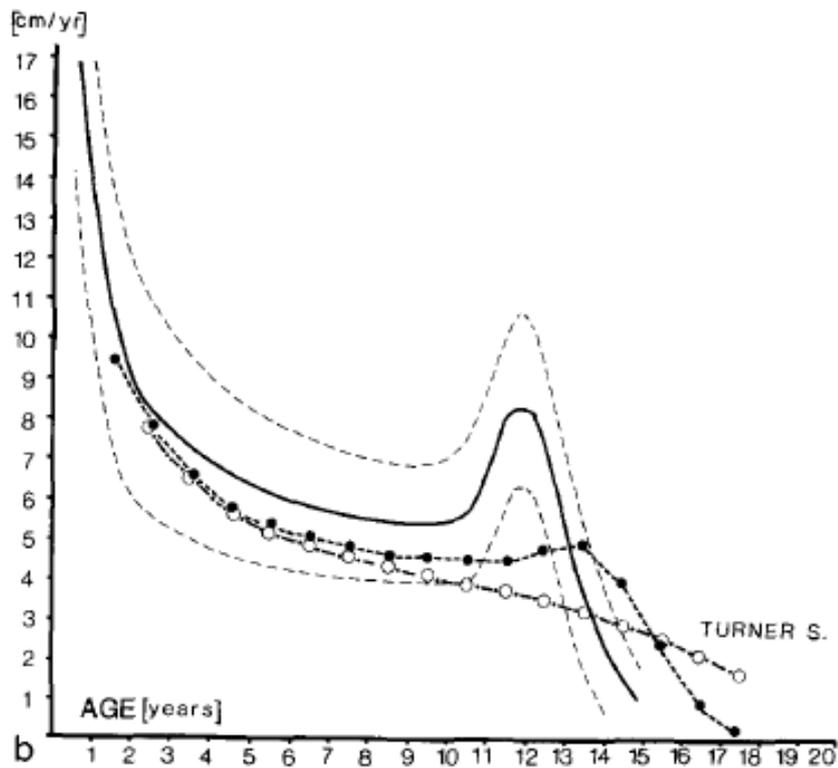
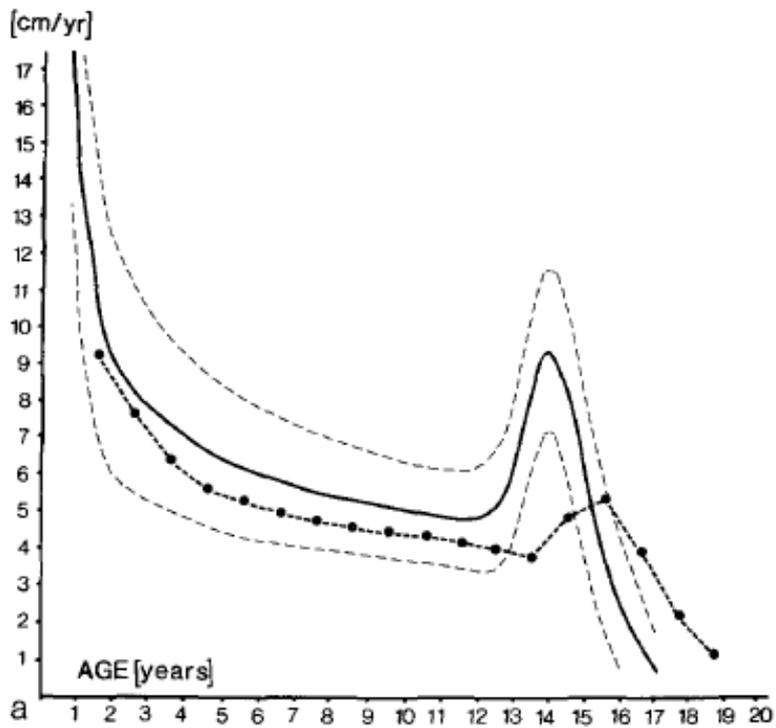


Figura 8: Velocità di crescita media in pazienti con sindrome di Noonan rispetto al range di normalità. **a** maschi, **b** femmine. (29)

Invece per quanto riguarda la circonferenza cranica (CC) le femmine tendono ad avere un valore di CC nella norma mentre il 57% dei maschi ha una CC sotto al terzo percentile per età. (Fig. 9)

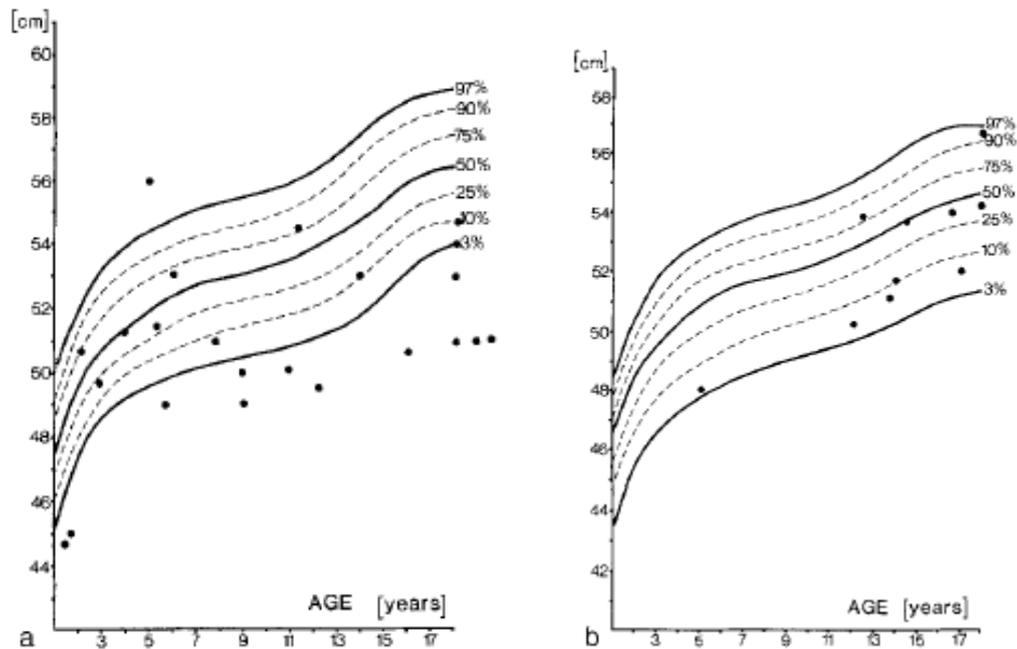


Figura 9: Circonferenza cranica in pazienti Noonan paragonata ai percentili nella norma. **a** maschi (n=23), **b** femmine (n=10). (29)

Il valore di statura definitiva in questi pazienti in età adulta risulta essere al di sotto di 1,9 deviazioni standard score (SDS) rispetto all'altezza media finale di una popolazione sana e normalmente viene raggiunta alla fine della seconda decade di vita. (29,31)

Infatti, l'altezza media riportata per la popolazione europea Noonan adulta risulta essere per le donne circa $152,7 \pm 5,7$ cm e per gli uomini $162,5 \pm 5,4$ cm, valori entrambi al di sotto del terzo per centile. (29)

In relazione a tutto ciò che è stato precedentemente descritto, sono state elaborate nel 1988 delle curve di crescita specifiche per i soggetti affetti da sindrome di Noonan sulla base dei dati clinici a disposizione, e successivamente riviste e incluse nelle linee guida per la gestione di questa patologia. (Figg. 10-13)

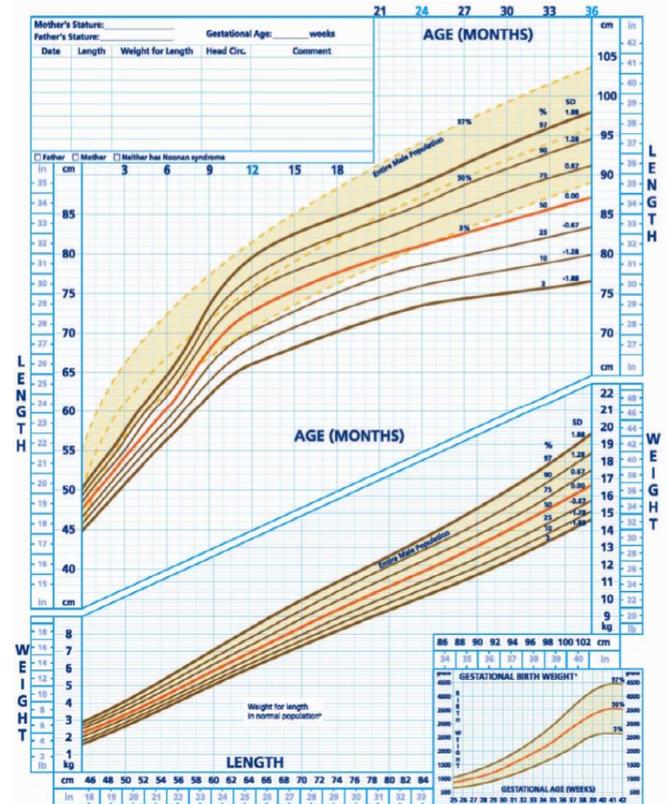
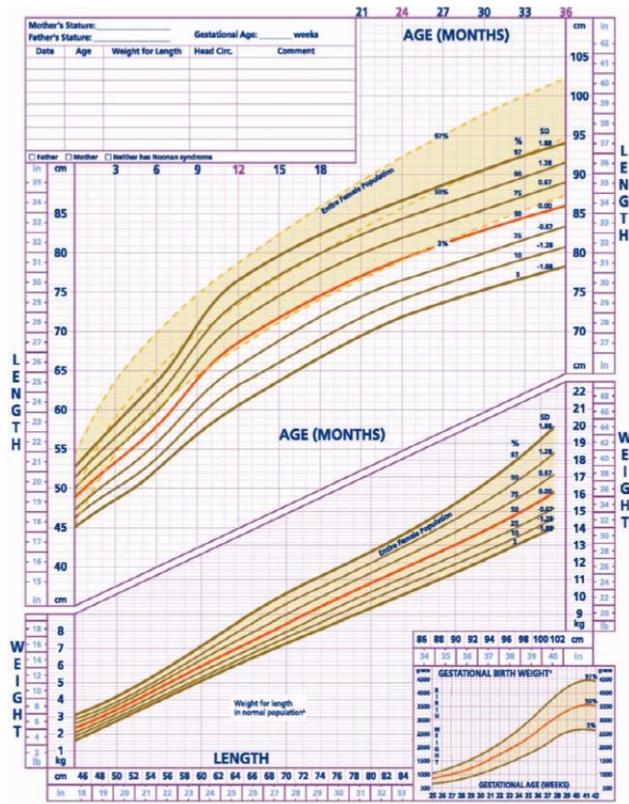


Figura 10-11: Curve di crescita specifiche per la sindrome di Noonan: sesso femminile (a sinistra) e maschile (a destra) da 0 a 36 mesi (lunghezza per età e peso per lunghezza).

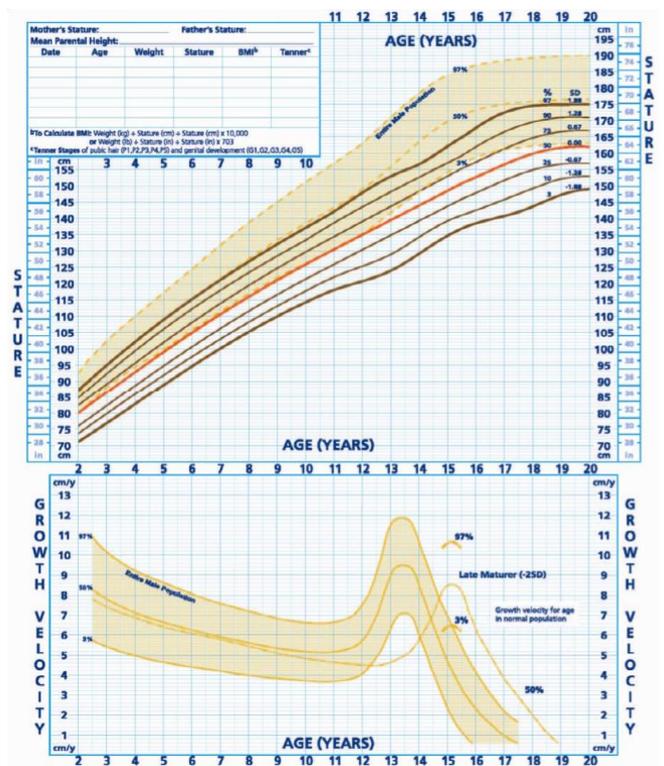
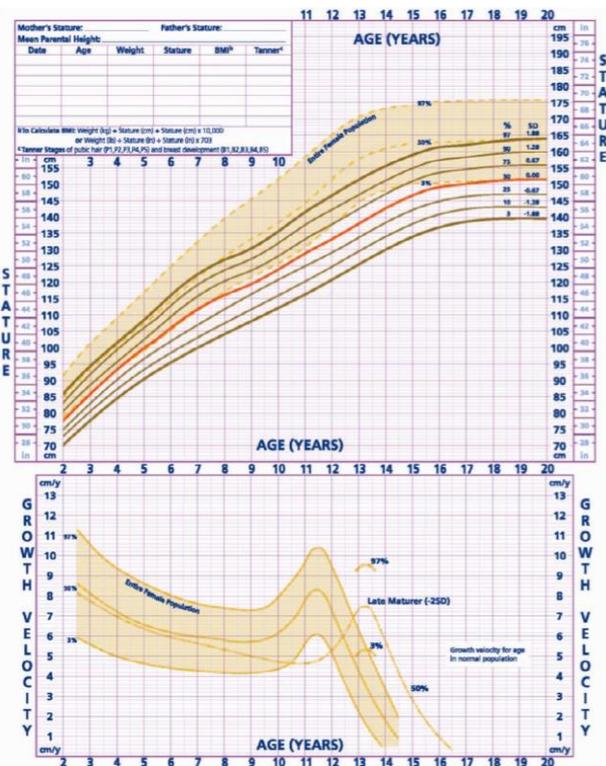


Figura 12-13: Curve di crescita specifiche per la sindrome di Noonan: sesso femminile (a sinistra) e maschile (a destra) da 2 a 20 anni (altezza e velocità di crescita per età).

Le cause dell'ipostaturalità riscontrato in questi pazienti sono multifattoriali e sono legate a: deficit di ormone della crescita (GH) il quale è essenziale per la crescita post-natale, insensibilità al GH e disfunzione neuro-secretoria. (1,16)

In particolare, si è registrata una più alta prevalenza di bassa statura nei pazienti con mutazione di PTPN11 (che tendono anche ad avere livelli inferiori di IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1)) e una più bassa prevalenza nei casi con mutazione di SOS1. Questo perché PTPN11 codifica per la proteina SHP-2 che normalmente spegne la cascata di segnale GHR-JAK2-STAT5. Dunque, la mutazione gain-of-function a carico di questo gene genera una proteina SHP-2 iper-attivata e di conseguenza una resistenza all'azione del GH. Per questo motivo i pazienti PTPN11 mutati tendono anche ad avere una minore velocità di crescita e un minor guadagno staturale in SDS durante la terapia sostitutiva con GH. In relazione a ciò questa mutazione rappresenta quindi un predittore farmacogenetico di scarsa risposta alla terapia con GH.

Invece la mutazione del gene SOS1 non essendo direttamente coinvolta nel pathway GHR-JAK2-STAT5 è associata generalmente ad una statura normale ma presenta spesso un riscontro di macrosomia fetale e macrocefalia, probabilmente legata all'iper-attivazione del sistema RAS/MAPK che ha influenza positiva sulla crescita fetale. (3,32)

Qualunque sia la causa dell'ipostaturalità, la terapia consiste nella somministrazione sottocute di rhGH (recombinant human GH), la cui risposta dipende da svariati fattori, tra cui la dose di rhGH e il tipo di mutazione genetica acquisita.

In particolare, il trattamento con somatotropina è regolamentato dalla nota AIFA 39 la quale indica che:

- Per i bambini sotto ai 2 anni di vita non è necessario effettuare test farmacologici se la RMI ha dimostrato una anomalia della adenoipofisi associata a quella del peduncolo o/e della neuroipofisi in un bambino con decelerazione della velocità di crescita o segni clinici riferibili a ipostaturalità e/o ipoglicemia.
- In età evolutiva la bassa statura da deficit di GH è definita dai seguenti parametri clinico-auxologici e di laboratorio:

I. Parametri clinico – auxologici:

a) statura \leq -3 DS

Oppure

b) statura \leq 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; nei primi 2 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);

Oppure

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

Associate a:

II. Parametri di laboratorio:

a) risposta di GH < 8 $\mu\text{g/L}$ a due test farmacologici (quelli di prima scelta sono GHRH+arginina e ITT (insulin tolerance test)) eseguiti in giorni differenti;

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

Vari studi affermano l'efficacia di questa terapia nei pazienti Noonan trattati (valutata monitorando velocità di crescita, guadagno staturale e livelli di IGF-1), mostrando una significativa differenza tra pazienti che ricevono somatotropina e pazienti che non la ricevono.

A tal proposito, riporto uno studio turco multicentrico eseguito nel 2016 in cui si evidenzia una variazione staturale in SDS da $-3,62 \pm 1,4$ a $-2,85 \pm 0,96$ dopo tre anni di terapia alla dose di 0.25 ± 0.05 mg/kg/sett (35.7 $\mu\text{g/kg/die}$); soggetti trattati avevano un'età iniziale media di 9.8, vs 8.7 anni nei non trattati. Viene inoltre posta l'attenzione sulla differenza di incremento staturale tra pazienti Noonan che fanno terapia e pazienti non trattati durante i tre anni di follow-up, come evidenziato nella tabella sottostante (Tabella 1) riportata direttamente dallo studio in questione. (33)

	In terapia con GH (n=47)	Senza terapia (n=37)	p-value
Guadagno staturale al primo anno di follow-up	0,4±0,44	0,12±0,5	0,08
Guadagno staturale totale al secondo anno di follow-up	0,75±0,55	0,14±0,73	0,001
Guadagno staturale totale al terzo anno di follow-up	0,76±0,41	0,02±1,04	0,009

Tabella 1: Guadagno staturale in pazienti con sindrome di Noonan in terapia con GH e senza terapia.

Un altro studio svedese poi ha riportato il raggiungimento di un valore di statura definitiva più alto di circa 13 cm nei maschi rispetto all'altezza definitiva media dei pazienti Noonan non trattati ($174,5 \pm 7,8$ cm vs $162,5 \pm 5,4$ cm), legato anche ad un più prolungato periodo di crescita puberale, e 9,8 cm nelle femmine ($157,7 \pm 4,7$ cm vs $152,7 \pm 5,7$ cm) con l'utilizzo di rhGH per circa 10 anni (un gruppo di 10 pazienti ha fatto GH con dose 33 µg/kg/die da 7,7+2,1 anni fino a 17,6+1,7 anni, un altro gruppo di 15 pazienti ha iniziato GH (66 µg/kg/die) a 8,6+3,3 anni e lo ha terminato a 18,4+2,1 anni. Dunque, la terapia con GH (dose sufficiente 33 µg/kg/die) migliora il valore di statura definitiva raggiungibile da questi pazienti con un guadagno medio di 1,7 SDS. In più, il guadagno di altezza prepuberale è mantenuto fino al raggiungimento della statura definitiva e circa il 60% dei pazienti raggiunge un'altezza vicina al valore del proprio target genetico. (34) In entrambi gli studi citati non venivano utilizzati i valori di IGF-1 ma bensì il peso corporeo per la modifica della dose di rhGH.

In relazione allo studio appena descritto, si riportano di seguito (Tabella 2) i dati di altezza media SDS ed età media a inizio terapia, inizio pubertà e altezza finale sulla base dei riferimenti per la sindrome di Noonan.

	Inizio terapia	Inizio pubertà	Altezza finale
MASCHI (n=12) Età (anni) Altezza SDS	8,6 ± 3,4 -0,2 ± 0,4	13,2 ± 1,9 1,1 ± 0,8	19,5 ± 1,4 1,8 ± 1,1 (174,5±7,8 cm)
FEMMINE (n=13) Età (anni) Altezza SDS	7,7 ± 2,2 -0,4 ± 0,5	11,6 ± 1,2 -0,5 ± 0,6	17,0 ± 1,5 1,0 ± 0,7 (157,7±4,7 cm)

Tabella 2: Andamento staturale in pazienti con NS in terapia con GH

Inoltre, il US National Cooperative Growth Study ha recentemente dimostrato un guadagno staturale (da inizio terapia al raggiungimento di statura definitiva) pari 10.9 ± 4.9 cm per i maschi e

9.2 ± 4.0 cm per le femmine, con età media di inizio terapia pari a 11,6 anni in entrambi i sessi e con durata di terapia pari a 5,6 anni. (30)

Come emerso quindi dagli studi precedentemente citati, importanti fattori contribuenti all'entità del guadagno staturale sono: durata del trattamento in età prepubere e valore di statura SDS alla pubertà. Ciò, suggerisce come ci sia un maggior potenziale di crescita più precocemente si inizia la terapia, tenendo conto che comunque circa il 17-18% dell'altezza adulta viene normalmente acquisita durante la pubertà. (30,34,35)

Alcuni studi però hanno riportato una minore efficacia del trattamento con rhGH (e livelli più bassi di IGF-1 durante la terapia) in pazienti con mutazione di PTPN11 legata proprio alla moderata resistenza all'azione del GH che sembra essere parzialmente compensata dall'aumentata secrezione di GH: questi pazienti, infatti, tendono ad avere dei livelli più elevati di GH sia durante la secrezione notturna spontanea sia durante il test da stimolo con arginina e livelli più bassi di IGF-1 e IGFBP-3. (31,36)

Tuttavia, in realtà, è poi emerso in studi successivi che i casi PTPN11 mutati avevano un guadagno staturale simile ma avendo in partenza un'importante bassa statura tendevano ad avere poi un più basso valore di statura definitiva. (33,35)

Per quanto riguarda l'età ossea invece, è emerso che la terapia con GH si associa ad un suo avanzamento pari a 1.1/1.2 anno/anno. Dunque, la differenza tra età ossea ed età cronologica tende progressivamente a ridursi dopo un anno di terapia. In particolare, l'avanzamento dell'età ossea appare più veloce nei pazienti con una età ossea più ritardata all'inizio della terapia e vi è quindi, una correlazione inversa tra l'età ossea all'inizio della terapia e il valore di altezza SDS dopo un anno di rhGH: coloro che avevano dimostrato un importante guadagno staturale non avevano una età ossea particolarmente avanzata.

Alla luce di ciò, dato che i pazienti Noonan iniziano la terapia avendo una età ossea particolarmente ritardata, è verosimile che l'accelerazione della bone age durante la terapia rifletta una sua normalizzazione e non una sua reale accelerazione. (37,38)

1.3 Pubertà

1.3.1 Fisiologia pubertà:

La pubertà è una fase dello sviluppo dell'organismo dove si assiste ad una accelerazione della crescita corporea (legata all'interazione del sistema GH-IGF-I e degli steroidi sessuali in primis gli estrogeni che promuovono in entrambi i sessi sia la produzione di IGF-I a livello cartilagineo sia l'attivazione dell'asse GH-IGF-I) e alla maturazione sessuale. Nei paesi industrializzati l'età di inizio della pubertà è andata via via declinando nel corso dell'ultimo secolo e attualmente la pubertà si verifica tra 8-13 anni nelle femmine e tra 9-14 anni nei maschi. Ciò che si verifica con l'inizio della pubertà è una riduzione della sensibilità delle strutture ipotalamiche all'inibizione dovuta al feedback negativo esercitato dagli ormoni sessuali. Quindi la secrezione pulsatile di GnRH aumenta, incrementando la secrezione di gonadotropine e di conseguenza quella degli ormoni gonadici. In particolare, nel maschio, l'ormone luteinizzante (LH) stimola le cellule di Leydig e secernere testosterone, mentre l'ormone follicolostimolante (FSH) stimola le cellule del Sertoli e anche la gametogenesi. Queste ultime poi producono anche inibina che a sua volta va ad inibire la secrezione di FSH.

Nella donna invece, l'FSH stimola le cellule della granulosa a produrre estrogeni e i follicoli a secernere inibina, mentre l'LH tende ad avere un ruolo minore almeno fino al menarca dove poi assume un ruolo principale nel promuovere l'ovulazione, la secrezione di progesterone dal corpo luteo e di androgeni da parte delle cellule della teca.

Con la pubertà si ha lo sviluppo di caratteri sessuali secondari (quantificabili con la scala proposta da Tanner che considera nella donna lo sviluppo della ghiandola mammaria e dei peli pubici, nell'uomo lo sviluppo dell'apparato genitale esterno e dei peli pubici), l'accelerazione della crescita corporea (spurt puberale) e modifiche comportamentali.

- Caratteri sessuali secondari:

nella femmina il primo segno clinico di pubertà è lo sviluppo del bottone mammario (telarca o B2 secondo Tanner) dovuto all'azione degli estrogeni ovarici. A pubertà istituita comparirà poi il menarca, segno della completa maturazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi che si verifica con la comparsa del feedback positivo agli estrogeni.

Nel maschio invece, il primo segno clinico di pubertà è la pigmentazione dello scroto e l'aumento del volume dei testicoli pari o superiore a 4 ml (stadio G2 secondo Tanner) dato

soprattutto dallo sviluppo dei tubuli seminiferi (FSH-dipendente). L'accelerazione della crescita staturale è più tardiva.

- Spurt puberale:

circa il 17-18% dell'altezza adulta è acquisita durante la pubertà. La disparità di altezza tra uomini e donne dipende in gran parte dal differente momento di inizio (nella femmina lo spurt comincia nella prima fase della pubertà e termina all'epoca del menarca, nei maschi invece inizia nel fase medio-puberale) e di zenit dello spurt puberale. I maschi infatti sono generalmente solo 2 cm più alti delle femmine quando queste iniziano lo spurt, ma crescono ancora 3-4 cm per anno per un paio di anni prima di iniziare il loro sviluppo puberale e hanno poi un picco di velocità di crescita maggiore delle femmine (circa 10 vs 9 cm/anno). Responsabili dello spurt puberale sono sia il sistema GH-IGF-I sia gli steroidi sessuali, in particolare gli estrogeni che a basse dosi stimolano sia la produzione di IGF-I a livello delle cartilagini di accrescimento sia l'attivazione dell'asse GH-IGF-I. A sua volta sempre gli estrogeni, che alla fine della pubertà sono ad alte dosi, provocano l'arresto della crescita mediante la saldatura delle cartilagini di accrescimento.

Durante il periodo puberale si verifica anche il processo di mineralizzazione ossea: la massima velocità di mineralizzazione (picco di massa ossea) è ritardata di 1-2 anni rispetto al picco di velocità di crescita in entrambi i sessi. Questo sfasamento dei due picchi rende le ossa dell'adolescente più fragili rispetto a quelle dell'adulto e quindi a maggior rischio di frattura.

1.3.2 Pubertà ritardata e spurt puberale nella sindrome Noonan:

In base alla bibliografia disponibile, l'età media di inizio della pubertà risulta essere ritardata di circa due anni rispetto a quella della popolazione generale ed inoltre è caratterizzata da un ridotto o comunque ritardato spurt puberale. (1,16). In maniera più dettagliata si riscontra in questi pazienti:

- L'età media di **inizio pubertà** (stadio 2 Tanner) è pari a 13,4 anni nei maschi (range: 10,8-16,4 anni) con un 35% che entra nel periodo puberale dopo i 13,5 anni, e invece è pari a 13 anni per le femmine (range: 10,9-15 anni) con un 44% di casi che entra in stadio 2 di Tanner più tardivamente. (30)

Sulla base di uno studio effettuato da Moniez et al. (2018, European Journal of Endocrinology) è stata registrata innanzitutto una correlazione inversa tra l'età di inizio pubertà e il BMI SDS soprattutto nelle femmine, nei maschi invece i dati a tal proposito

sono meno consistenti. In particolare, nei maschi non è stata evidenziata una relazione lineare tra massa grassa ed età di inizio pubertà ritardata dato che sono stati riscontrati casi di pubertà ritardata sia in soggetti maschi molto magri sia in soggetti obesi.

Sulla base di ciò che è stato riportato precedentemente, i soggetti affetti da sindrome di Noonan tendono ad avere un BMI al di sotto del range di normalità e ciò influenzerebbe l'età di insorgenza della pubertà. Infatti, la relazione tra massa grassa e pubertà è mediata da diversi fattori, tra cui la leptina (ormone prodotto dagli adipociti che segnalerebbe all'organismo la disponibilità di riserve energetiche) i cui livelli infatti sono generalmente molto bassi nei pazienti Noonan. La leptina, appunto, avrebbe un ruolo particolare nella maturazione del GnRH pulse generator e dunque nell'inizio della pubertà. Inoltre, la leptina, oltre a regolare l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, ha anche un effetto sulla funzione testicolare e sulla spermatogenesi. Infatti, essa inibisce la secrezione di testosterone mediante l'inibizione dell'espressione di geni regolanti la spermatogenesi.

Nonostante il ritardo di inizio puberale, la pubertà nei pazienti Noonan inizia spontaneamente e ciò sta ad indicare la presenza di un normale input ipotalamo-ipofisario, a fronte invece di una insufficienza testicolare primaria legata proprio ad una disfunzione delle cellule del Sertoli (caratterizzata dalla presenza di livelli di testosterone normali, perché secreto dalle cellule di Leydig, ma bassi livelli di inibina B e AMH prodotti dalle cellule del Sertoli) presente nei maschi Noonan. Sono poi stati riscontrati un 25% di pazienti maschi con severo ipogonadismo primario con azoospermia e severa oligospermia. (14)

Infine, alcuni case reports suggeriscono che gli adulti Noonan di sesso maschile potrebbero avere un rischio aumentato di osteopenia in relazione all'ipo-estrogenismo e al conseguente aumentato riassorbimento osseo. (1,39)

- L'età media all'inizio dello stadio 4 di Tanner è pari a 15,7 anni per i maschi (range: 11,3-19,4 anni) e 15,4 anni per le femmine (range: 13,4-18,4 anni). Inoltre, la progressione dallo stadio 2 allo stadio 4 di Tanner ha una durata pari a meno di 2 anni nel 52% dei maschi e nel 38% delle femmine.
- Per quanto riguarda invece lo spurt puberale, un altro elemento estremamente importante è legato al fatto che la durata della pubertà (dallo stadio 2 di Tanner allo stadio 4) è fortemente correlata con il guadagno staturale puberale in centimetri (proprio per l'interazione esistente tra GH e ormoni sessuali) sia nei maschi sia nelle femmine e a sua

volta il valore di altezza SDS all'inizio della pubertà rappresenta un importante fattore contributivo al raggiungimento della statura definitiva.

In particolare, i bambini Noonan non trattati con rhGH tendono ad avere un ridotto guadagno staturale puberale soprattutto nei maschi che tendono infatti ad avere una perdita staturale (che si aggiunge al loro deficit staturale preesistente) che va da di -0,3 fino a -0,4 SD durante la pubertà. Le femmine invece tendono ad avere un maggior guadagno staturale (che va da -0,2 a +0,2 SD) in età puberale rimanendo comunque più basse rispetto alle femmine della popolazione generale. Per entrambi i sessi l'entità del guadagno staturale in età puberale è direttamente correlata con il valore di altezza SDS a inizio pubertà. Questa perdita di guadagno staturale in età puberale risulta essere ancora più evidente in quel 52% di maschi e 38% di femmine che hanno una progressione puberale di durata inferiore ai due anni. Questo riscontro, dunque, sottolinea l'importanza di normalizzare e ottimizzare l'altezza (iniziando precocemente la terapia) prima dell'inizio della pubertà. (30)

1.4 Eziologia e RAS-MAPK Pathway

Dal punto di vista eziologico questa sindrome è legata ad un gruppo di mutazioni gain-of-function nella via di segnale RAS-MAPK (RAS-mitogen-activated-protein-kinase) coinvolta nei processi biologici di differenziazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare. In particolare, diversi ormoni, tra cui l'ormone della crescita (GH) e insulin-like growth factor 1 (IGF-1) agiscono legandosi a recettori tirosin chinasi che stimolano proprio la via RAS-MAPK e per questo tra le caratteristiche fenotipiche più importanti troviamo: bassa statura, pubertà ritardata e/o criptorchidismo nei maschi.

Le proteine RAS (HRAS, NRAS, KRAS, RRAS, RRAS2, RRAS3, RAPS, RAEB, RALS, RIT1, RIT2) sono delle proteine G monomeriche con attività GTPasica responsabili della trasduzione, integrazione e organizzazione intracellulare degli inputs extracellulari.

In particolare, la stimolazione dei recettori ad attività tirosin chinasi da parte di fattori di crescita come IGF, EGF (epidermal growth factor) o TGF (transforming growth factor), citochine o ormoni porta alla formazione di domini recettoriali autofosforilati in grado di legare proteine intracellulari che contengono domini SH2 come ad esempio: SHC, SHP-2 (codificata dal gene PTPN11), GRB-2.

Queste molecole vanno a loro volta a reclutare dei fattori GNEFs (Guanosine Nucleotide Exchange Factors) come SOS1 che promuovono la trasformazione da RAS-GDP (inattivo) a RAS-GTP (attivo).

RAS-GTP attiva il MAPK pathway (cioè la cascata RAF-MEK-ERK).

In maniera più specifica: RAS-GTP attiva le serin treonin chinasi RAF (RAF1, BRAF, ARAF) che a loro volta attivano MEK 1 e MEK 2 e successivamente ERK 1 e ERK 2 (Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2). Infine le MAP chinasi attivate sia regolano attività citoplasmatiche sia si spostano dal citosol al nucleo dove fosforilano fattori di trascrizione (come Fos, Jun, Myc) regolando così il ciclo cellulare (3,32). (Fig.14)

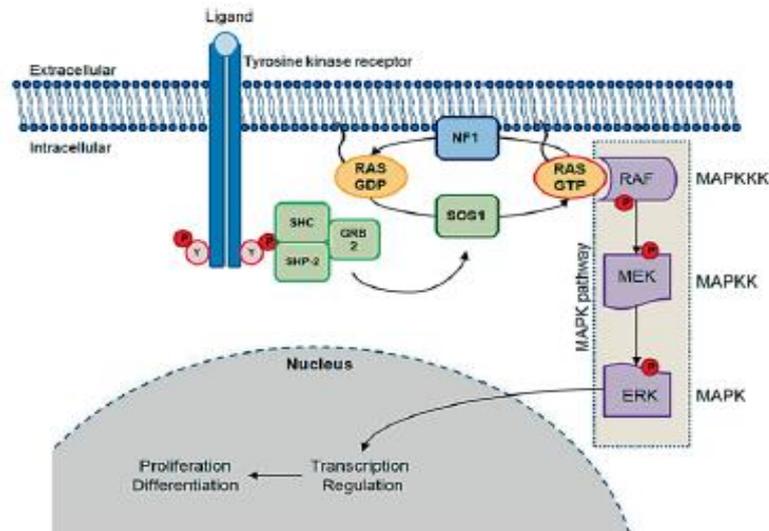


Figura 14: SHC = Signaling and transforming protein containing Src homology 2 and 3 (SH2 and SH3) domains; SHP-2 = Src homology region 2-domain phosphatase 2; GRB2 = growth factor receptor-bound protein 2; SOS 1 = son of sevenless 1; NF1 = neurofibromin;
RAS = rat sarcoma viral oncogene homolog; RAF = murine sarcoma viral oncogene homolog; MEK = mitogen-activated kinase; ERK = mitogen-activated kinase.
(Jorge A. et al., Noonan Syndrome and Related Disorders: A Review of Clinical Features and Mutations in Genes of the RAS/MAPK Pathway, Horm Res 2009)

In realtà l'esistenza di diverse mutazioni somatiche a carico del sistema RAS-MAPK è nota già da molto tempo a causa del loro ruolo determinante nella tumorigenesi. Si stima che mutazioni somatiche attivanti RAS si riscontrino in circa il 30% dei tumori (es. mutazioni di KRAS sono comuni nei tumori pancreatico, colon-rettale, endometriale, polmonare e cervicale; mutazioni di KRAS e NRAS in neoplasie mieloidi come la JMML sporadica; mutazioni di NRAS e HRAS in melanoma e tumore della colecisti), mentre mutazioni somatiche a carico di PTPN11 sono responsabili di insorgenza di neoplasie ematologiche (sono stati riscontrati 34% dei casi con JMML non sindromica, una piccola percentuale con sindrome mielodisplastica e leucemia mieloide acuta) (3,40,41).

A differenza delle mutazioni somatiche, quelle germinali sono associate all'insorgenza di RASopatie (3) di cui fanno parte la sindrome di Noonan, la sindrome cardio-facio-cutanea, la sindrome di Costello, la sindrome di Legius, la sindrome di Noonan con multiple lentiggini (precedentemente denominata sindrome LEOPARD), la sindrome di Mazzanti (sindrome Noonan-line con loose anagen hair) e la neurofibromatosi di tipo 1. A questo gruppo di patologie si associa una clinica maggiormente variabile che dipende dal tipo di gene specifico mutato. È stato infatti dimostrato che il grado di disregolazione del RAS-MPAK pathway è il principale determinante fenotipico. Con "grado di disregolazione" si intende: tipo di proteina mutata, la sua localizzazione nel pathway, la sua regolazione con meccanismi di feedback, tipo di mutazione specifica e entità del gain-of-function (32).

Ad esempio, la mutazione del gene PTPN11 (riscontrabile in 50-60% dei pazienti Noonan) è responsabile di un terzo dei casi di leucemia mielomonocitica giovanile.

Infatti gli individui affetti da sindrome di Noonan con mutazione PTPN11 hanno una aumentata prevalenza di leucemia mielomonocitica giovanile mentre quelli con mutazione PTPN11, SOS1, RAF sono più suscettibili all'insorgenza di tumori benigni a cellule giganti (lesioni costituite dalla fusione di cellule isto-fibroblastiche) che colpiscono prevalentemente l'osso mandibolare e che vengono di norma trattate con curettage chirurgico (5). Tuttavia, queste patologie si riscontrano solo in una piccola percentuale di pazienti Noonan aventi queste mutazioni. Ciò sta ad indicare come sia necessario l'intervento di un fattore aggiuntivo ancora sconosciuto (come fattori epigenetici, geni modificatori ecc....) per consentire l'insorgenza di leucemia o tumore a cellule giganti (3).

Le mutazioni del sistema RAS-MPAK sono alla base anche di disregolazioni a carico del sistema endocrino. In particolare, una delle manifestazioni fenotipiche peculiari della sindrome di Noonan è appunto la bassa statura a cui si aggiunge l'insufficienza testicolare primaria per disfunzione delle cellule del Sertoli.

Tutto ciò sta a dimostrare come alla base della sindrome di Noonan ci sia una alterata autoinibizione di vari segnali appartenenti al sistema RAS-MPAK (3).

1.5 Mutazioni genetiche causative di sindrome Noonan

1.5.1 Prevalenza mutazioni

Sono diversi i geni che, se mutati, sono coinvolti nello sviluppo della sindrome di Noonan e proprio in relazione al tipo di mutazione acquisita si può anche evidenziare una certa

correlazione genotipo-fenotipo. La prevalenza delle varie mutazioni riscontrabili può essere così riassunta (Tabella 3):

Mutazioni	Prevalenza
PTPN11	50%-60%
SOS1	10%-15%
RIT1	9%
RAF1	5%
SOS2	3%
LZTR1	3%
BRAF	2%
MAP2K1	2%
KRAS	1%
NRAS	rara
SHOC2	rara
CBL	rara

Tabella 3: Prevalenza mutazioni

1.5.2 Storia e specificità

Nel 1994, Jamieson e collaboratori condussero un'analisi di linkage che portò all'individuazione del primo locus genico causativo localizzato sul cromosoma 12q24.1 che fu denominato NS1. Successivamente si capì che si trattava di una sindrome con eterogeneità genetica. (16)

In maniera più dettagliata, le mutazioni causative di sindrome di Noonan sono:

1. **PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11)**: fu individuato da Tartaglia e collaboratori nel 2001 ed è stato il primo gene, appartenente alla regione cromosomiale 12q24.1, ad essere correlato alla sindrome di Noonan.

Rappresenta la mutazione con maggiore prevalenza. Questa mutazione germinale missenso risulta essere associata a stenosi polmonare (45-70%) o difetti del setto interatriale tipo ostium secundum, bassa statura, deficit del fattore VIII con diatesi emorragica, deformità toraciche, dismorfismi facciali (80% basso impianto delle orecchie, 68% down-slanting palpebrale e linea di impianto posteriore dei capelli) ed è correlata ad una minor incidenza di cardiomiopatia ipertrofica e coartazione dell'aorta. Inoltre, una sua mutazione specifica (731Ile) è stata riscontrata in circa la metà dei bambini con sindrome di Noonan e leucemia mielomonocitica giovanile. (4,16)

Questo gene ha tre domini: il dominio N-amino terminale src-homology 2 (N-SH2), il dominio fosfotirosin fosfatasi (PTP) che è quello più frequentemente mutato, e infine il dominio C-amino terminale src-Homology 2 (C-SH2).

Inoltre, PTPN11 è un gene che codifica per la proteina SHP-2 (Src-homology 2 domain-containing phosphatase) la quale, a seguito di questa mutazione gain-of-function, risulta essere costitutivamente attiva. SHP-2 è fondamentale per lo sviluppo embrionario delle valvole cardiache semilunari e svolge un ruolo importante di regolazione della cascata di trasduzione intracellulare di RAS/MAPK: in particolare la proteina SHP-2 costitutivamente attivata blocca la trasduzione di segnale intracellulare mediata dal legame GH-recettore e dunque dà una resistenza all'azione del GH generando così un ipostaturismo più marcato. (1,42)

- 2. SOS1 (Son of Sevenless homolog 1):** è il secondo gene più frequentemente mutato, riscontrato nella regione 2p22-p21. Esso codifica per una proteina RAS-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) che converte la proteina RAS da RAS-GDP a RAS-GTP (forma attiva). La mutazione gain-of-function di SOS1 genera un blocco nella auto-inibizione dell'attività della RAS-GEF.

Dal punto di vista fenotipico, i pazienti SOS1 mutati tendono ad avere maggiormente (84% dei casi) anomalie ectodermiche (cheratosi pilare/pelle ipercheratosica, sopracciglia rade e sparse, capelli sottili e ricci) con assenza di deficit cognitivi o comunque deficit di minor entità e macrocefalia.

In merito alle anomalie cardiache, 83% dei casi presentano stenosi polmonare che tipicamente è associata a difetti del setto inter-atriale (35%) e una bassa prevalenza (<10%) di cardiomiopatia ipertrofica.

Vi è una minor prevalenza (29%) di bassa statura (cioè altezza al di sotto del 3°centile) rispetto alla popolazione Noonan generale.

Infine, è stata riscontrata in questi pazienti una aumentata incidenza di tumori solidi (in particolare rhabdomyosarcoma embrionario) e pochi casi di lesioni mandibolari a cellule giganti. (4,42,43)

- 3. RAF1 (v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1):** Nel 2007 Pandit et al. analizzarono una coorte di 231 pazienti negativi alle mutazioni allora conosciute (PTPN11, SOS1, KRAS) come responsabili della sindrome di Noonan. Così riuscirono ad individuare

un ulteriore gene: RAF1. Questo gene codifica per una serin-treonin chinasi che attiva la cascata MEK-ERK.

4. Questa mutazione è riscontrata in circa il 5% dei pazienti Noonan e ha una forte associazione con la cardiomiopatia ipertrofica (80% dei casi), riscontrata, in particolare, nei casi con mutazione a carico del dominio CR2: è stato infatti dimostrato in vitro che la proteina mutata individuata nei pazienti con cardiomiopatia ipertrofica era responsabile di una attivazione costitutiva di ERK, a dimostrazione di come RAF1 sia fondamentale per lo sviluppo della normale struttura e funzione del miocardio.

Inoltre, in circa un terzo dei casi sono stati riportati anche presenza di nevi multipli, lentiggini o macchie café au lait. (42,44,45)

5. **KRAS (kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)** : questo gene (come anche i geni NRAS e HRAS), riscontrato nella regione 12p12, codifica per proteine RAS ad attività GTPasica associate alla membrana citoplasmatica: la loro funzione è quella di regolare l'entità della trasduzione intracellulare dei vari segnali provenienti dall'esterno attraverso un continuo passaggio dalla forma attiva (legante GTP, che a sua volta attiva una serie di proteine effettrici, tra cui RAF) a quella inattiva (legante GDP).

Nel 2006 Schubert et al., hanno riscontrato questa mutazione germinale in circa il 5% dei pazienti Noonan PTPN11 negativi: essa causava una ridotta attività GTP-idrolitica della proteina causando così una iper-attivazione di RAS.

Dal punto di vista fenotipico questi bambini tendono ad avere tutti un severo ritardo cognitivo, maggiore rispetto a tutto il resto della popolazione Noonan. (42,46)

6. **NRAS (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog)**: l'identificazione di mutazioni a carico di questo gene risale al 2009 grazie ad una analisi condotta da Cirstea et al. in una coorte di 917 individui negativi alle altre mutazioni allora note e con fenotipo suggestivo.

La mutazione germinale di NRAS è meno frequente rispetto a quella di KRAS, questo probabilmente è in relazione con le severe conseguenze che questa mutazione ha sullo sviluppo embrionario e fetale. (47)

7. **BRAF (V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)**: BRAF appartiene alla famiglia dei geni RAF (ARAF, CRAF1 e BRAF) e codifica per la proteina B-RAF che possiede una maggior attività MEK-chinasica rispetto alle altre. Questa proteina, che catalizza la fosforilazione di serina e treonina sulle proteine bersaglio, è attivata attraverso il legame

con RAS-GTP. Le mutazioni di maggior frequenza sono a carico dei domini CR1 e CR3 del gene.

Mutazioni germinali a carico di BRAF sono di maggior riscontro nella sindrome cardio-facio-cutanea (prevalenza di 50-75% dei casi), mentre mutazioni somatiche si riscontrano in alcune forme tumorali come melanomi, carcinomi tiroidei linfomi non Hodgkin, adenocarcinoma del polmone e glioblastoma. Invece, i bambini Noonan BRAF mutati (prevalenza <2%), a differenza dei casi affetti da sindrome cardio-facio-cutanea, tendono ad avere: riduzione della crescita neonatale, difficoltà nell'alimentazione, bassa statura, dismorfismi facciali tipici (dolicocefalia, fronte prominente, ipertelorismo, basso impianto delle orecchie con elice ispessito), deficit cognitivi lievi-moderati (87%), anomalie scheletriche, ridotto tono muscolare. Infine, solo in 3 casi sono stati riscontrati nevi multipli e lentiggini scure e in 2 casi cardiomiopatia ipertrofica e stenosi della valvola polmonare. Ciò sta a suggerire come il fenotipo derivante dalle alterazioni germline di BRAF possa dipendere dallo specifico allele mutato. (1,42,48)

- 8. MAP2K1 (mitogen activated protein kinase 1):** è un gene appartenente alla regione cromosomiale 15q22 e codifica per la proteina MEK responsabile dell'attivazione delle ERK chinasi. Anch'essa risulta essere di più frequente riscontro nella sindrome cardio-facio-cutanea ma nel 2007, Nava et al. identificarono mutazione a carico di MAP2K1 in 4,2% di pazienti Noonan negativi per PTPN11 e SOS1.

La proteina MEK svolge un ruolo cruciale nello sviluppo embrionale e in particolare nella migrazione cellulare e nello sviluppo placentare. (42,49)

- 9. SHOC2:** Nel 2009 Cordeddu et al. individuarono questo nuovo gene e in relazione al fenotipo che ne risultava, fu chiamata sindrome Noonan-like con loose anagen hair.

SHOC2 codifica per una proteina scaffold che agisce come modulatore positivo della via RAS/MAPK. In particolare, attraverso il legame con MRAS-GTP, promuove la traslocazione di PP1C (protein phosphatase 1) sulla membrana, consentendo la defosforilazione e quindi l'attivazione di RAF1 da parte di quest'ultimo. La mutazione a carico di SHOC2, riscontrata in circa il 5% dei pazienti in studio, favorisce la miristilazione della proteina e quindi una traslocazione costitutiva di PP1C sulla membrana cellulare cui consegue una attivazione costitutiva di RAF1 e quindi un aumento della sua attività MAPchinasi.

Questi bambini tendono ad avere i tipici dismorfismi facciali della sindrome di Noonan, una crescita ridotta legata ad un provato deficit di GH, deficit cognitivi, comportamenti iperattivi che migliorano con l'età in molti soggetti, loose anagen hair o sindrome dei

capelli caduchi in anagen (capelli molto fragili, sottili, sparsi e con crescita rallentata), molti tendono ad avere aumentata pigmentazione cutanea con eczema o ittiosi e anomalie cardiache (displasia valvola mitrale e difetti settali). A volte alcuni di questi bambini tendono ad avere elementi fenotipici suggestivi di sindrome di Costello o sindrome cardio-facio-cutanea. (1,50)

- 10. CBL:** nel 2010 Martinelli et al. individuarono questa nuova mutazione genetica germline in circa 1% dei pazienti affetti da sindrome di Noonan. Questa mutazione è caratterizzata da una importante variabilità fenotipica: crescita ridotta, ritardo cognitivo, criptorchidismo, anomalie cardiache (atrio sinistro dilatato, aritmie ventricolari caotiche, valvola aortica bicuspidica e stenotica, insufficienza mitralica), mielinizzazione cerebrale ritardata, ipoplasia del verme cerebellare e predisposizione alla JMML.

In particolare, la proteina CBL è una ubiquitin ligasi E3 e regola negativamente il flusso di segnali intracellulari derivanti dall'attivazione dei recettori tirosin-chinasici grazie all'interazione tra ubiquitina e recettori che porta alla loro internalizzazione e successiva degradazione. Le mutazioni a carico di questo gene alterano proprio il sito di legame della proteina CBL riducendo la degradazione dei recettori e aumentando il flusso di segnali intracellulari. (1,51)

- 11. RIT1 (Ric-like protein without Caax motif 1):** è una mutazione, riscontrata per la prima volta da Aoki et al. nel 2013, presente in circa il 9% dei pazienti Noonan negativi a tutte le altre mutazioni precedentemente elencate.

RIT1 è un gene che codifica per una proteina con attività GTPasica e quindi la sua mutazione gain-of-function genera una iperattivazione del pathway RAS/MAPK e di conseguenza del fattore di trascrizione ELK1.

I pazienti Noonan con questa mutazione risultano avere: alta incidenza di difetti cardiaci congeniti (94%) in particolare cardiomiopatia ipertrofica (71%, frequenza simile a quella riscontrata nei pazienti RAF1 mutati, ciò a dimostrazione di come probabilmente sia RIT1 sia RAF1 interagiscano tra loro e abbiano lo stesso effetto sullo sviluppo cardiaco) e stenosi della valvola polmonare (65%), minor incidenza di bassa statura e lieve disabilità intellettiva. (42,52)

- 12. RASA2:** mutazione loss-of-function di questo gene (causante sempre una iper-attivazione di RAS/MAPK) è stata riscontrata in un piccolo numero di pazienti e in un unico studio. (4,53)

13. SOS2 (Son of Sevenless homolog 2): nel 2015, Yamamoto et al. riportarono questa mutazione riscontrata in circa il 4% dei casi. Dato che SOS1 e SOS2 sono omologhi per il 70%, anche i pazienti SOS2 mutati presentano una più alta incidenza di anomalie ectodermiche. (42)

14. LZTR1 (leucine-zipper-like transcriptionregulator 1): nello stesso studio precedente è stata individuata anche questa mutazione a carico di un gene non appartenente al sistema RAS/MAPK. Questo gene probabilmente svolge un ruolo cruciale nel controllo dei processi cellulari (come il ciclo cellulare e la regolazione della conformazione della cromatina). Ha una prevalenza pari a circa il 3% di tutti i pazienti Noonan. (4,42)

15. PPP1CB (protein phosphatase one catalytic subunit beta): mutazioni missenso a carico di questo gene sono state osservate in uno studio che mostra una condizione di overlap clinico con gli individui SHOC2 mutati. (4,54)

1.6 Relazione genotipo-fenotipo:

Sulla base di ciò che è stato ampiamente descritto in precedenza, è possibile delineare una correlazione genotipo-fenotipo che potrebbe orientare inizialmente il clinico nella diagnosi e nel follow-up successivo. Questa relazione può essere così riassunta (Tabella 4):

Tabella 4: Relazione genotipo-fenotipo

Mutazione genetica	Apparato cardiovascolare	Caratteristiche auxologiche	Viso, cute e capelli	Deficit cognitivi	Altro
PTPN11 (50-60%)	Stenosi della valvola polmonare; minor incidenza di cardiomiopatia ipertrofica o difetti atriali settali (tipo ostium secundum)	Bassa statura importante con bassa contrazione di IGF-I	Dismorfismi facciali tipici	Pazienti con mutazione N308D e N308S hanno una lieve o assente disabilità intellettiva	Maggior incidenza di diatesi emorragica e leucemia mielomonocitica giovanile
SOS1 (10-15%)	Stenosi della valvola polmonare, minor incidenza di difetti del setto interatriale	Minor prevalenza di bassa statura	Macrocefalia, anomalie ectodermiche (cheratosi pilare/pelle ipercheratosica, sopracciglia e ciglia rade e sparse, capelli sottili, radi e ricci). (Fenotipo simile a sindrome cardio-facio-cutanea)	Spesso assente, a volte ritardi del linguaggio	Aumentata incidenza di tumori solidi (rabdomiosarcoma embrionario, tumore testicolare a cellule del Sertoli) e tumori benigni a cellule giganti a livello mandibolare
RAF1 (5%)	Elevata incidenza di cardiomiopatia ipertrofica	---	Maggior frequenza di nevi, lentiggini, macchie café au lait	---	---
BRAF (2%)	---	---	Dolicocefalia, sopracciglia e ciglia rade o assenti	Deficit cognitivo lieve-moderato	Ipoplasia nervo ottico e riduzione dell'acuità visiva, anomalie scheletriche, ridotto tono muscolare
KRAS (1%)	---	---	Tratti più grossolani con naso prominente	Ritardo cognitivo severo	---
NRAS (<1%)	---	---	---	---	---
SHOC2 (rara)	Aumentata incidenza di difetti settali	Bassa statura spesso associata a deficit di GH	Capelli radi, sottili, fragili e con crescita rallentata, cute iperpigmentata	Comportamento iperattivo	---
RIT1 (9% dei casi negativi per tutte le altre mutazioni)	Frequente stenosi della valvola polmonare, aumentata incidenza di cardiomiopatia ipertrofica	Statura spesso all'interno del range di normalità	---	Deficit cognitivo lieve	---

1.7 Diagnosi e diagnosi differenziale

1.7.1 Diagnosi sindrome di Noonan

Attualmente la diagnosi di sindrome di Noonan è clinica e viene effettuata utilizzando uno scoring system (basato sulle manifestazioni cliniche descritte approfonditamente da van der Burgt nel 1997(6)) elaborato a seguito della collaborazione di vari centri nell'ambito del progetto DYSCERNE.

Questo scoring system rientra nelle linee guida europee per la diagnosi e la gestione dei pazienti affetti da sindrome di Noonan (da 0 a 18+ anni).

In particolare, si può stabilire diagnosi di sindrome di Noonan qualora vi siano (Tabella 5):

- dismorfismi facciali tipici + 1 criterio maggiore o 2 minori;
- dismorfismi facciali suggestivi + 2 criteri maggiori o 3 minori. (55)

CRITERI MAGGIORI	<ul style="list-style-type: none"> • Cuore: stenosi della valvola polmonare e/o cardiomiopatia ipertrofica; • Altezza < 3° centile per sesso e per età; • Torace: petto carenato/escavato; • Storia familiare: parente di primo grado con diagnosi certa di sindrome di Noonan; • Presenza di: disabilità cognitive + criptorchidismo + displasia linfatica.
CRITERI MINORI	<ul style="list-style-type: none"> • Cuore: presenza di altri difetti rispetto a quelli già elencati nei criteri maggiori; • Altezza: <10° centile per sesso ed età; • Torace ampio; • Storia familiare: parente di primo grado con diagnosi suggestive di sindrome di Noonan; • Presenza di qualcuno tra: disabilità cognitive, criptorchidismo e displasia linfatica

Tabella 5: Criteri diagnostici maggiori e minori per sindrome di Noonan.

Durante il processo diagnostico importante è, oltre ad una attenta anamnesi ed esame obiettivo, l'esecuzione di alcune indagini strumentali per ottenere il riscontro di ulteriori criteri diagnostici: visita cardiologica con elettrocardiografia ed ecocardiografia per individuare segni di cardiopatia congenita, attenta valutazione neuropsicologica per ricercare e quantificare la disabilità intellettiva, attenta valutazione auxologica e calcolo del percentile specifico per sesso ed età.

Alla diagnosi clinica, segue poi una indagine genetica ed un adeguato counselling genetico per riscontrare l'eziologia specifica e per informare adeguatamente i genitori sulla storia naturale della malattia e sul rischio di ricorrenza della patologia in eventuali future gravidanze. Normalmente il primo gene testato è il PTPN11 proprio in relazione alla sua maggiore incidenza. Qualora questo fosse negativo, si procede con l'analisi dei geni SOS1, KRAS, RAF1, BRAF, NRAS e SHOC2 (qualora il paziente abbia fenotipo con loose anagen hair).

È importante tenere presente che solo nel 70% si riesce ad ottenere un riscontro genetico, nel restante 30% le indagini molecolari risultano essere non conclusive e per questo la diagnosi di sindrome di Noonan rimane tuttora una diagnosi clinica. Le tecniche attualmente utilizzate per la diagnosi genetica (sequenziamento dideossinucleotidico, cromatografia liquida ad alta prestazione, sequenziamento oligonucleotidico con microarray, next generation sequencing) vanno a ricercare la presenza di inserzioni o delezioni missenso nelle regioni codificanti dei geni noti. (16)

Esiste inoltre la possibilità di effettuare diagnosi prenatale di RASopatia attraverso l'utilizzo dell'ecografia come mezzo di screening seguito in primis dall'esecuzione di cariotipo ed Array-CGH per escludere anomalie cromosomiche o sub-cromosomiche e poi successivamente dall'esecuzione del test NGS (next generation sequencing) per RASopatia.

Le anomalie ecografiche suggestive di RASopatia (riscontrabili già a partire dalla 11° settimana di gestazione) che necessitano un approfondimento diagnostico sono: igroma cistico, idrope fetale, polidramnios, versamento toracico o ascitico, traslucenza nucale >6mm oppure evidenza di cardiopatia congenita riscontrabile, però, dopo la 14° settimana di gestazione. (12)

1.7.2 Diagnosi differenziale con RASopatie e altre sindromi

Dato che la diagnosi di sindrome di Noonan è, in primis, clinica, risulta fondamentale differenziarla da altre condizioni patologiche (RASopatie e non) mediante una attenta osservazione clinica, laboratoristica e genetica.

Nell'ambito delle RASopatie è importante differenziare la sindrome di Noonan dalle sindromi cardio-facio-cutanea, di Costello, di LEOPARD, sindrome Noonan-like con loose anagen hair e neurofibromatosi tipo 1. A tal proposito è importante prestare attenzione a questi elementi (Tabella 6) (4):

Patologia	Segni/sintomi di differenziazione	Test genetico
S. Cardio-facio-cutanea	Deficit cognitivi severi; tratti visivi più grossolani; alta frequenza di anomalie strutturali del SNC (idrocefalo e ventricolomegalia); maggior probabilità di displasia del nervo ottico e di crisi epilettiche; severa e persistente dismotilità gastrointestinale.	<ul style="list-style-type: none"> • Test genetico può identificare mutazioni a carico di BRAF, MAP2K1 e MAP2K2. • Anche se mutazioni di KRAS possono causare sia sindrome CFC sia s. di Noonan, il tipo di mutazione risulta essere differente
S. di Costello	Deficit cognitivo moderato, tratti visivi più grossolani, pieghe palmari e plantari profonde, aritmie atriali; papillomatosi perinasale, periorale e perianale; predisposizione allo sviluppo di tumori pari a 10-15% (rabbdomiosarcoma embrionario, neuroblastoma, tumore della colecisti).	Test genetico molecolare identifica mutazioni di HRAS.
S. di LEOPARD	Presenza di lentiggini che si sviluppano con l'età, sordità neurosensoriale, maggiore probabilità di sviluppo di cardiomiopatia ipertrofica.	Test genetico molecolare identifica mutazioni di PTPN11 e RAF1.
S. Noonan-like	Capelli sparsi, sottili, fragili e a lenta crescita; cute iperpigmentata; maggiore probabilità di displasia della valvola mitrale o difetti settali; deficit di GH con bassa statura; comportamento iper-attivo	Mutazione missenso ricorrente di SHOC2
Neurofibromatosi tipo 1	Segni tipici: lesioni cutanee iperpigmentate (macchie caffè latte, lentiginosi ascellare ed inguinale), neurofibromi benigni cutanei e subcutanei, noduli di Lish nell'iride; predisposizione importante allo sviluppo di neoplasie benigne e maligne; difficoltà di apprendimento	Test genetico molecolare identifica mutazioni di neurofibromina 1 (NF1)

Tabella 6: Diagnosi differenziale con RASopatie

Invece, tra le altre patologie (non appartenenti al gruppo delle RASopatie) con cui la sindrome di Noonan entra in diagnosi differenziale ritroviamo: la sindrome di Turner, la sindrome di Williams e la sindrome di Aarskog.

È importante dunque prestare attenzione a questi elementi differenziali (Tabella 7) (4):

Patologia	Segni/sintomi differenziazione	di	Test genetico
S. di Turner	Evidenza di ipogonadismo ipergonadotropo e cariotipo anomalo		Cariotipo evidenza anomalie cromosomiche (45, X)
S. di Williams	Stenosi aortica sopravvalvolare; ipercalcemia; dismorfismi facciali (edema periorbitale, filtro allungato e poco evidente, labbra carnose); carattere estremamente espansivo (cocktail party personality); deficit cognitivo variabile da lieve a grave.		È causata dalla delezione del cromosoma 7q11.23, identificato mediante la tecnica FISH (ibridazione fluorescente in situ).
S. di Aarskog	Dita corte con articolazioni iper-estensibili e pliche interdigitali; dismorfismi facciali con fronte alta e prominente, plica trasversale sotto il labbro inferiore, scroto "a scialle"; non particolari difficoltà intellettive.		Test genetico molecolare identifica mutazioni di FGD1 sul cromosoma X (patologia ad eredità X-linked).

Tabella 7: Diagnosi differenziale con altre sindromi

1.8 Follow-up e trattamento

Dopo aver posto diagnosi, fondamentale è un adeguato follow-up per la diagnosi precoce, per il monitoraggio e per la terapia delle eventuali comorbidità associate a questa sindrome. A tal proposito le linee guida sviluppate dal Noonan Syndrome Guideline Development Group stabiliscono una adeguata programmazione delle valutazioni da effettuare per ogni fascia di età così da individuare precocemente eventuali comorbidità ed attuare strategie terapeutiche e di follow-up adeguate.

Dunque, le varie visite ed i vari accertamenti da effettuare in base alle fasce di età sono così organizzate (Tabella 8):

ETA'	VISITE ed ACCERTAMENTI
Periodo neonatale (0-1 mese)	<p>Visita cardiologica con ecocardiografia ed elettrocardiografia;</p> <p>Misura dei parametri auxologici (peso, lunghezza e circonferenza cranica);</p> <p>Valutare la presenza di un eventuale criptorchidismo nei maschi;</p> <p>Ecografia renale: studio di anatomia renale e ureterale;</p> <p>Valutazione per eventuale presenza di ipotonia, difficoltà nell'alimentazione e scarso accrescimento.</p>
Lattante (1 mese – 1 anno)	<p>Misura dei parametri auxologici (peso, altezza, circonferenza cranica) e valutarli nelle curve di crescita della popolazione generale e in quelle specifiche per la sindrome;</p> <p>Valutare lo sviluppo motorio;</p> <p>Controllare e trattare la presenza di eventuali otiti medie;</p> <p>Ripetere la valutazione cardiologica e gastroenterologica (qualora persista difficoltà ad alimentarsi);</p> <p>Fare valutazione oftalmologica e otorinolaringoiatrica e stabilire adeguata sorveglianza in base ai riscontri patologici.</p>
Prima e seconda infanzia (1-5 anni)	<p>Misurazione annuale dei parametri auxologici e controllo delle relative curve di crescita (considerare eventualmente un test di stimolo del GH qualora vi sia bassa statura/ridotta velocità di crescita);</p> <p>Valutazione della capacità verbale a circa 2 anni di età;</p> <p>Valutazione neuropsichiatrica del comportamento;</p> <p>Effettuare una valutazione coagulativa (tempo di protrombina, di tromboplastina parziale, tempo di sanguinamento e conta piastrinica);</p> <p>Continuare le valutazioni oftalmologiche.</p>
Tarda infanzia (5-13 anni)	<p>Monitoraggio annuale di crescita, sviluppo e relazione sociale;</p> <p>Valutare il rendimento scolastico e il QI attraverso il WISC-RN test (Wechsler Intelligence Scale for Children Revised), il RPM (Raven Progressive Matrices) e il VM (Visual-Motor Integration);</p> <p>Follow-up cardiologico annuale se presenti anomalie.</p>
Adolescenza ed età adulta (13-21 anni)	<p>Monitorare gli stadi puberali secondo Tanner;</p> <p>Valutare l'asse ipofisi-gonadi nei maschi qualora vi sia un ritardo puberale evidente;</p> <p>Continuare il follow-up cardiologico;</p> <p>Valutazione della coagulazione andrebbe ripetuta qualora vi siano segni clinici evidenti;</p> <p>Rivalutare la performance scolastica.</p>

Tabella 8: Follow-up sindrome di Noonan

Per quanto riguarda il trattamento invece, il tipo di terapia da effettuare in questi pazienti dipende proprio dalle comorbidità e dalla loro gravità. Le comorbidità (e dunque anche le relative terapie) di maggior frequenza sono:

- **Criporchidismo:** l'unica terapia possibile è un approccio chirurgico mediante un'incisione inguinale o scrotale. Il timing ottimale per l'intervento è tuttora dibattuto ma dati recenti suggeriscono che si avrebbe una migliore preservazione della spermatogenesi, della produzione gonadica ormonale e un minor rischio di tumore testicolare qualora l'intervento venisse effettuato precocemente, prima dei 2 anni o alcuni addirittura suggeriscono prima di 1 anno. (4)
- **Difetti cardiaci congeniti:** il tipo di terapia e il timing dipendono proprio dal tipo di patologia riscontrata. In caso di displasia della valvola polmonare si potrebbe inizialmente valutare una valvuloplastica con catetere a palloncino ma spesso è necessaria una sostituzione valvolare. Invece la presenza di cardiomiopatia ipertrofica generalmente viene trattata utilizzando beta-bloccanti o calcio-antagonisti, ma occasionalmente potrebbe richiedere una miomectomia qualora vi fosse un eccessivo ostacolo al tratto di efflusso.

Un adeguato follow-up cardiaco è necessario anche in età adulta proprio in relazione al tasso di morbidità e mortalità ad esso correlato.

- **Ipostaturalità:** fondamentale è il follow-up endocrinologico e la terapia con ormone della crescita ricombinante (rhGH) per aumentare il guadagno staturale (tenendo presente la nota AIFA 39 precedentemente descritta) e per raggiungere una statura finale che rientri nei margini di normalità. La risposta alla terapia viene valutata mediante le ripetute misure auxologiche (effettuate all'istituto G. Gaslini ogni 6 mesi) e il dosaggio di IGF-I. È importante tenere presente che l'entità della durata della terapia nel periodo prepuberale rappresenta un importante fattore contribuente al guadagno staturale totale.

Il rhGH è somministrato sottocute, alla sera. Il dosaggio previsto è pari a 0,025-0,05 mg/kg/die per 6 giorni a settimana e deve essere periodicamente adattato alle variazioni di peso. I protocolli suggeriscono di incrementare la dose a 0.03-0.07 mg/Kg/die e di somministrare il farmaco tutti i giorni durante la pubertà per massimizzare la crescita longitudinale durante questo periodo della vita.

Per quanto riguarda gli effetti collaterali legati a questa terapia, diversi studi hanno dimostrato che dopo tre anni di terapia con GH non si sono registrate alterazioni di glicemia, emoglobina glicata, trigliceridi e colesterolo. È stato registrato in pochi casi un aumento temporaneo dei livelli di insulina (soprattutto nei pazienti trattati con dosi maggiori: 66 µg/kg/die) (34).

Inoltre, non vi è evidenza di ispessimento ventricolare sia dopo 1 anno di terapia con dose 0,05mg/kg/die sia dopo un trattamento a lungo termine (circa 5,6 anni). Il problema subentra nel trattare bambini RAF1 mutati che presentano già una cardiomiopatia ipertrofica, la quale potrebbe progredire con la terapia. Per questo motivo è raccomandato uno stretto monitoraggio ecocardiografico durante la terapia con rhGH. Altra condizione da monitorare strettamente è la possibile insorgenza di tumori maligni e benigni legata all'effetto di promozione della crescita data dalla terapia: sono stati registrati 1 caso di linfoma dopo 3 anni di terapia e 1 caso di ricorrenza di granuloma mandibolare a cellule giganti.

Dunque, la terapia con GH è fondamentale in questi bambini e non sembra esserci una correlazione stretta tra uso di rhGH e sviluppo di effetti avversi cardiaci o metabolici. Rimane comunque importante monitorare strettamente gli aspetti cardiologici, metabolici e tumorali soprattutto in bambini che hanno già queste comorbidità. (37,38)

Infine, si riporta di seguito tabella AIFA con effetti collaterali, registrati nei bambini, legati all'utilizzo del GH (Tabella 9):

Comune (da 1 su 100 a 1 su 10 casi)	Non comune (da 1 su 1.000 a 1 su 100 casi)	Raro (da 1 su 10.000 a 1 su 1.000 casi)	Molto raro (meno di 1 su 10.000)	altri
<p>Dolore nel sito di iniezione</p> <p>Gonfiore (edema)</p> <p>Iperglicemia</p> <p>Ipersensibilità al metacresolo e/o al glicerolo</p> <p>Bassi livelli dell'ormone tiroideo</p> <p>Sviluppo di anticorpi contro l'ormone della crescita</p> <p>Progressione della scoliosi (aumento della curvatura laterale della colonna vertebrale)</p>	<p>Debolezza</p> <p>Diabete mellito Tipo 2</p>	<p>Ricorrente o intenso mal di testa con nausea e/o problemi alla vista sono segni di aumentata pressione cerebrale (ipertensione endocranica benigna).</p> <p>Intorpidimento e sensazione di formicolio (parestesia)</p> <p>Dolore muscolare localizzato (mialgia)</p>	<p>Insonnia</p> <p>Ipertensione</p> <p>Ginecomastia</p> <p>Glicosuria</p>	<p>Ipersensibilità al principio attivo</p>

Tabella 9: Effetti collaterali terapia GH, AIFA.

- **Difficoltà nell'alimentazione:** considerare eventualmente il posizionamento di un sondino naso-gastrico, se necessario.

1. RAZIONALE DELLO STUDIO

Il 50-70% dei bambini affetti da sindrome di Noonan presenta ipostaturalità.

L'alterazione del pathway RAS-MAPK coinvolge siti recettoriali per fattori di crescita come le IGF-1. Dati disponibili su casistiche includenti tra 25-65 pazienti per lo più con diagnosi esclusivamente clinica hanno evidenziato un guadagno staturale tra 0.76 e 1,8 SD dopo tempi di trattamento variabili da 3 anni a 7,5 anni in soggetti trattati con rhGH pur con scarsi dati di confronto rispetto a coorti non trattate. Per tale ragione l'unico trattamento al momento disponibile è il rhGH, dal 2020 prescrivibile anche in Italia per patologia secondo NOTA AIFA 039. Emergono tuttavia discrepanze sull'endpoint staturale in base all'etnia di appartenenza e ai criteri di inclusione delle casistiche studiate. Come ben noto la pubertà rappresenta un momento cruciale per l'ottimizzazione dell'accrescimento, tuttavia pazienti con SN non sembrano presentare un regolare spurt puberale e avvio puberale e durata risultano poco studiati.

Obiettivo del nostro studio è dunque valutare l'impatto del GH e dello sviluppo puberale sull'accrescimento lineare di un'ampia corte monocentrica geneticamente determinata.

2. DISEGNO DELLO STUDIO:

Studio retrospettivo monocentrico

Obiettivo primario dello studio:

Valutare l'andamento staturale in pazienti con sindrome di Noonan trattati e non trattati con rhGH.

Obiettivi secondari:

- Valutare il timing dell'attivazione puberale
- Valutare l'impatto del timing dell'attivazione puberale sull'endpoint staturale
- Valutare l'impatto del tipo di mutazione genetica sull'endpoint staturale

3. ENDPOINT DELLO STUDIO

Attività biologiche del GH:

- Misure di altezza (cm, SDS), peso (kg, SDS), BMI (SDS), circonferenza cranica (cm, SDS), velocità di crescita (cm/anno, SDS) alla prima visita (baseline), al raggiungimento dello stadio B2 (per le femmine) e G2 (per i maschi) secondo Tanner ed infine all'ultimo

controllo. Per i pazienti Noonan affetti da GHD anche a visita pre-inizio rhGH, a 6 mesi, a 12 mesi, a 24 mesi dall'inizio della terapia;

- Radiografia del carpo per stabilire l'età ossea al baseline, stadio B2/G2 secondo Tanner, ultimo controllo. Per i GHD anche a visita di controllo pre-GH, 12 mesi e 24 mesi da inizio terapia;
- Dosaggio di IGF-I come marcatore biologico dell'attività dell'ormone della crescita al baseline, stadio B2/G2 secondo Tanner, ultimo controllo. Per i GHD anche a visita di controllo pre-GH, 6 mesi, 12 mesi e 24 mesi da inizio terapia.

Analisi puberale clinica e laboratoristica:

- Stadiazione dello sviluppo puberale secondo Tanner al baseline, pre-inizio rhGH, 6mesi, 12 mesi, 24 mesi da inizio terapia, ultimo controllo;
- Età a cui è stato possibile dosare per la prima volta LH ed estradiolo (per le femmine) / testosterone (per i maschi);
- Età a cui LH ed estradiolo/testosterone sono diventati persistentemente dosabili;
- Dosaggio annuale di LH ed estradiolo/testosterone dall'età di 7 anni a 15 anni.

4. PAZIENTI

Sono stati arruolati i pazienti seguiti presso il centro di endocrinologia dell'Istituto Giannina Gaslini, Università di Genova rispettando i seguenti criteri di inclusione ed esclusione.

Criteri di inclusione:

Pazienti affetti da sindrome di Noonan con:

1. diagnosi genetica molecolare dimostrata;
2. almeno 2 misurazioni antropometriche durante il follow-up
3. in terapia o non in terapia con rhGH

Criteri di esclusione:

1. Pazienti con fenotipo Noonan ma senza genetica dimostrata.
2. Pazienti con sindrome di Noonan con una sola valutazione clinica.

5. METODI

Sono stati raccolti retrospettivamente dati demografici, antropometrici, relativi alla terapia con rhGH ed allo sviluppo puberale di 22 pazienti con sindrome di Noonan geneticamente dimostrata seguiti presso l'istituto Giannina Gaslini.

1) Dati auxologici:

- Alla nascita: peso (g, SDS), lunghezza (cm, SDS), circonferenza cranica (cm, SDS), età gestazionale;*
- Peso (kg, SDS), altezza (cm, SDS), BMI (kg/m^2 , SDS), circonferenza cranica (cm, SDS), velocità di crescita (cm/anno, SDS), età alla prima visita (BASELINE), al T4 (stadio Tanner B2/G2) e al T5 (ultimo controllo) per i pazienti non GHD; **
- Peso (kg, SDS), altezza (cm, SDS), BMI (kg/m^2 , SDS), circonferenza cranica (cm, SDS), velocità di crescita (cm/anno, SDS), età alla prima visita (BASELINE), al T0 (visita prima dell'inizio della terapia con rhGH), al T1 (dopo 6 mesi da inizio terapia), al T2 (dopo 12 mesi da inizio rhGH), al T3 (dopo 24 mesi da inizio rhGH), al T4 a (stadio Tanner B2/G2) e al T5 (ultimo controllo) per i pazienti con GHD; **
- Guadagno staturale (cm, SDS) rispetto a visita precedente al T1, T2, T3, T4, T5;
- Guadagno staturale totale (cm, SDS): per i pazienti con GHD equivale al Δ tra statura T5-T0, per i pazienti senza GHD equivale al Δ T5-BASELINE;
- Stadio puberale secondo Tanner valutato a BASELINE, T0, T1, T2, T3, T4, T5;
- Età primo LH e primo estradiolo/testosterone dosabile;
- Età LH ed estradiolo/testosterone persistentemente dosabile.

* i dati antropometrici neonatali in SDS sono stati calcolati utilizzando INeS Charts.

** i dati relativi al BMI SDS sono stati calcolati utilizzando il sistema di BMI-for-age della World Health Organization.

2) Dati biochimici *:

- Dosaggio IGF-I (ng/ml, SDS) a BASELINE, T0, T1, T2, T3, T4, T5 in pazienti con e senza GHD;
- Concentrazione dei primi LH (U/L), estradiolo/testosterone (ng/dL) dosabili;

- Concentrazione di LH (U/L), estradiolo/testosterone (ng/dL) per ogni anno da 7 a 15 anni.

* Tutti i dosaggi sono stati effettuati mediante chemoluminescenza

3) Imaging:

- Radiografia del carpo al BASELINE, T0, T2, T3, T4, T5 in pazienti con e senza GHD. *

*la valutazione dell'età ossea è stata effettuata secondo il metodo radiografico di Greulich e Pyle.

5.1 Analisi statistica.

I dati qualitativi saranno descritti come frequenza, mentre quelli quantitativi (variabili antropometriche, biochimiche e di imaging) come mediana, interquartile (IQR), range (Min-Max) in merito a dati non normalmente distribuiti. Le analisi verranno condotte per femmine e maschi separatamente e per il gruppo in toto se non riscontrate differenze di genere.

Le differenze tra i dati quantitativi (variabili continue) in base a gruppi di analisi di interesse (es. con GHD e senza GHD oppure pazienti con mutazione PTPN11 e con altre mutazioni non PTPN11) saranno valutate mediante approccio statistico di tipo non parametrico utilizzando il test di Mann-Whitney.

Al fine di costruire modelli di regressione multipla, i gruppi di interesse sono stati convertiti a variabili continue (es F =0, M=1, con GHD=1 e senza GHD=0 oppure pazienti con mutazione PTPN11=0 e con altre mutazioni non PTPN11=1, prepuberi/puberi= 0/1, attivazione puberale </> 8 anni=1/0). L'analisi di regressione multipla per la predizione della statura all'ultima visita sarà eseguita considerando vari modelli: a) in base a statura al baseline, sesso, target genetico SDS; 2) in base a GHD si/no, IGF-1 SDS, durata trp con GH; 3) attivazione puberale </> 8 anni.

6. RISULTATI

6.1 Descrizione della coorte in studio

La coorte dello studio è costituita da 22 soggetti, 11 femmine e 11 maschi affetti da sindrome di Noonan. Criterio fondamentale per la selezione della coorte presentata è stato il riscontro di mutazioni genetiche note in letteratura come causative della patologia.

La distribuzione genotipica è rappresentata in percentuale nella Fig. 15; in particolare sono presenti, in ordine decrescente per frequenza, mutazioni a carico di:

PTPN11 (n=12), BRAF (n=4), KRAS (n=3), SOS1 (n=1), SHOC-2 (n=1), RIT-1 (n=1). Tutte le mutazioni individuate erano già descritte in letteratura.

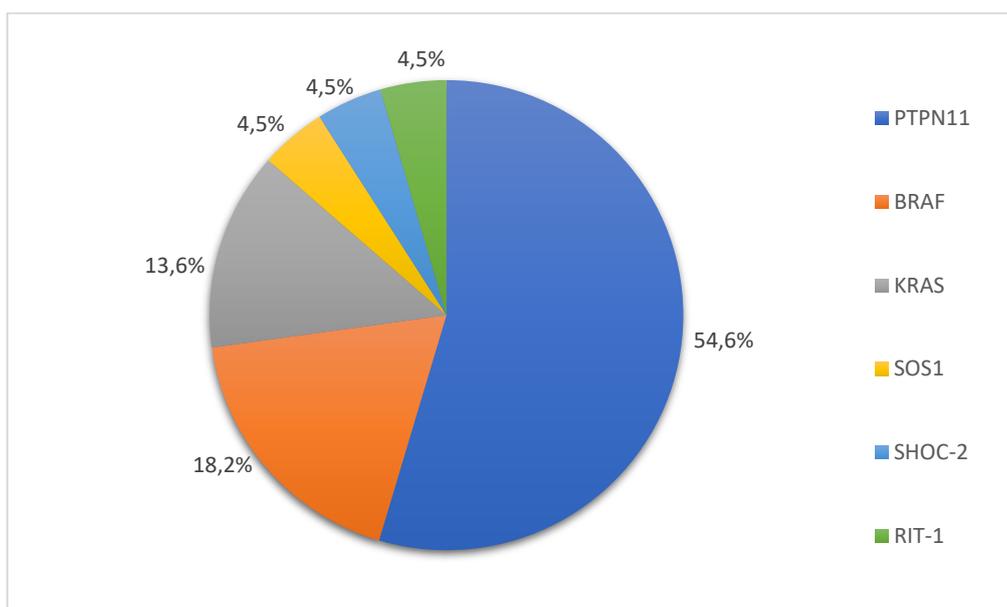


Figura 15: Distribuzione genotipica in percentuale della coorte in studio (n=22)

Dal punto di fenotipico e in merito alla relazione genotipo-fenotipo all'interno della nostra coorte sono emersi questi dati (Tabella 10):

	PTPN11 n= 12	BRAF n=4	KRAS n=3	SOS1 n=1	RIT-1 n=1	SHOC-2 n=1	TOTALE n=22
Dismorfismi facciali	12	4	3	1	1	1	22 (100%)
Alterazioni muscolo scheletriche: petto carenato/escavato, scoliosi, ipotonia...	7	1	-----	-----	1	1	10 (45,5%)
Difetti cardiaci congeniti:						-----	
• stenosi e/o displasia valvola polmonare	7	1	-----	1	1		
• cardiomiopatia ipertrofica	---	---	-----	---	---		
• difetti settali atriali	5	1	-----	1	---		
• anomalie valvola mitrale	3	1	1	---	1		
• anomalie valvola tricuspide	2	-----	1	---	-----		
• TOTALE	8	3	2	1	1		15 (68,2%)
Difficoltà alimentari	1	1	-----	-----	---	1	3 (13,6%)
Malformazioni renali	1	-----	2	-----	---	-----	3 (13,6%)
Difetti coagulativi	1 (deficit fatt. XI)	-----	-----	---	-----	---	1 (4,5%)
Deficit neuro-sensoriali: ipoacusia, strabismo, difetti di rifrazione...	4	3	1	---	---	1	9 (40,9%)
Anomalie pigmentazione cutanea (nevi, lentiggini, macchie café-au-lait)	1	1	1	---	-----	1	4 (18,2%)
Ritardo sviluppo psicomotorio	2	2	3	-----	-----	1	8 (36,4%)
Neoplasie	2 (DNET)	1 (germinoma)	-----	-----	---	---	3 (13,6%)
Criptochidimo:		-----	-----	-----	---	---	
• Monolaterale	2				1		
• Bilaterale	3				---		
• TOTALE	5				1		6 (54,4% sulla coorte maschile: 6/11)
Anomalie ipofisarie:			-----	-----	---	---	
• Ectopia neuroipofisi		1					
• Ipoplasia adenipofisi	1	1					
• TOTALE	1	2					3 (13,6%)
Deficit di GH (GHD)	3	3	2	1	---	1	10 (45,5%)
Anomalie sistema linfatico	-----	-----	1	-----	1	-----	2 (9,1%)
Nati SGA (Small for Gestational Age)	2	1	---	---	---	---	3 (13,6%)

Tabella 10: Relazione genotipo- fenotipo della coorte in studio

In particolare, indipendentemente dal genotipo, le manifestazioni fenotipiche con le relative comorbidità riscontrate nei pazienti Noonan della nostra coorte sono rappresentate da:

in primis dismorfismi facciali, riscontrati nel 100% dei pazienti. Successivamente, le comorbidità di più frequente riscontro sono rappresentate dai difetti cardiaci congeniti (circa 70% dei casi), alterazioni muscolo-scheletriche e deficit di GH (in poco meno del 50% dei casi), dai deficit neurosensoriali e dalla presenza di ritardo psicomotorio (circa 40% dei casi).

Altra anomalia estremamente frequente che colpisce però esclusivamente la coorte di sesso maschile è rappresentata dal criptorchidismo (in più del 50% dei casi) che può essere mono o bilaterale.

Di più raro riscontro sono risultati essere: malformazioni renali, difficoltà alimentari, anomalie di pigmentazione cutanea, anomalie ipofisarie, neoplasie (sono stati riscontrati due DNET e un germinoma), anomalie del sistema linfatico e deficit coagulativi.

Invece, in relazione al rapporto genotipo-fenotipo è emerso che:

1) PTPN11 (12/22): rappresenta il genotipo più frequente nella nostra coorte.

Per quanto riguarda l'ambito neonatale solo due pazienti sono risultati SGA alla nascita.

Per le comorbidità invece, sono i pazienti che presentano con maggior frequenza difetti cardiaci congeniti: l'anomalia di maggior riscontro è rappresentata dalla stenosi e/o displasia della valvola polmonare (58,3%, 7/12), seguita dai difetti settali inter-atriali (41,7%, 5/12). Di più raro riscontro sono le anomalie a carico delle valvole tricuspide e mitrale.

La seconda anomalia più frequente è il riscontro di criptorchidismo in 5 pazienti su 8 maschi totali (62,5%), seguita dai deficit neurosensoriali (33,3%, 4/12) e dal deficit di GH che è presente solamente in 1/3 dei nostri pazienti (25%, 3/12).

Di più raro riscontro invece sono: la presenza di neoplasie (sono stati riscontrati due casi di DNET (Dysembryoplastic neuroepithelial tumor): uno in un paziente con GHD che ha portato alla sospensione della terapia con rhGH per circa due anni a causa del suo aumento di dimensione, un altro in un paziente non GHD), le difficoltà alimentari (riscontrate in un unico paziente che però risulta essere portatore di PEG (gastrostomia endoscopica percutanea), ritardo psicomotorio, le malformazioni renali (un paziente

con doppio distretto renale destro), i difetti coagulativi (un unico caso con emofilia C ovvero deficit di fattore XI), anomalie di pigmentazione cutanea ed infine anomalie ipofisarie (un unico caso con ipoplasia dell'adenoipofisi).

- 2) BRAF (4/22):** rappresenta la seconda mutazione genetica più frequente nella nostra coorte.

È stato registrato un solo caso di neonato SGA, che insieme ai due neonati SGA PTPN11 mutati rappresentano gli unici tre casi di tutta la nostra coorte.

Le comorbidity di più frequente riscontro sono rappresentate in primis dai difetti cardiaci congeniti (senza avere una anomalia precisa di maggior riscontro), dai deficit neurosensoriali e dal deficit di GH (75% in tutti e 3 i casi, 3 su 4 totali).

Esattamente in metà di questi pazienti riscontriamo ritardo psicomotorio e anomalie ipofisarie (un caso con ipoplasia adenoipofisi e uno con ectopia della neuroipofisi).

Di più raro riscontro solo invece: alterazioni muscolo-scheletriche, difficoltà alimentari (unico caso ma portatore di sondino naso-gastrico), anomalie di pigmentazione cutanea, neoplasie (un unico caso con germinoma).

- 3) KRAS (3/22):** tutti questi pazienti hanno dimostrato di avere ritardo psicomotorio, seguito da altre due anomalie di maggior frequenza (presenti nel 50% dei casi) rappresentate da: difetti cardiaci congeniti, malformazioni renali e deficit di GH.

Di più raro riscontro risultano essere: deficit neuro-sensoriali, anomalie di pigmentazione cutanea e anomalie del sistema linfatico (un caso di displasia linfatica toracica bilaterale).

- 4) SOS1 (1/22):** in questo unico paziente sono stati riscontrati difetti cardiaci congeniti e deficit di GH.

- 5) RIT-1 (1/22):** in questo paziente invece sono stati riscontrati anomalie muscolo-scheletriche, deficit cardiaci congeniti, criptorchidismo monolaterale e anomalie del sistema linfatico (ipoplasia dei dotti linfatici con ascite).

- 6) SHOC-2 (1/22):** in questo paziente sono stati riscontrati alterazioni muscolo-scheletriche (petto scavato e cifosi), difficoltà alimentari (disfagia), deficit neuro-sensoriali (ipoacusia), anomalie di pigmentazione cutanea (1 macchia caffè-au-lait sulla coscia e 1 nevo rilevato al dorso), ritardo di sviluppo psicomotorio e deficit di GH.

6.2 Descrizione di antropometria, dati biochimici e radiografici alla prima valutazione (Baseline).

Durante la prima visita è stata effettuata un'anamnesi accurata relativa alla storia clinica della gravidanza, all'eventuale consanguineità dei genitori e una misura accurata della loro altezza per il calcolo del target height espresso poi in SDS.

Il target genetico è risultato avere una mediana pari a -0,7 SDS (range: -2,0-1,6), dunque all'interno del range di normalità e senza differenze significative tra i due gruppi analizzati.

I pazienti sono stati quindi valutati dal punto di vista clinico per i parametri sintetizzati in tabella 11 e dal punto di vista dell'età scheletrica.

Tabella 11: Parametri demografici, clinici, biochimici e radiologici nella coorte e in base ai pazienti che verranno diagnosticati come GHD e chi no. Test non parametrici: mediana (IQR) (Min-Max).

BASELINE	Totale n=22	Futuro GHD n= 10	No GHD n= 12
Età (anni) *	4,1 (1,9-8,5) (0,4-14,3)	2,9 (0,6-7,2) (0,4-8,6)	4,7 (2,8-12,3) (0,9-14,3)
Statura (SDS) *	-2,4 (-3,1- -1,9) (-4,2- -1,2) n=21	-3,0 (-3,9- -2,3) (-3,9- -2,2) n=9	-2,2 (-2,7- -1,4) (-4,2 - -1,2)
Target height (SDS)	-0,7 (-1,4- -0,1) (-2,0-1,6) n=21	-1,0 (-1,2 - -0,6) (-1,8-1,0)	-0,3 (-1,5 - 0,3) (-2,0-1,6) n=11
Peso (SDS)	-2,8 (-3,7- -1,6) (-4,7-0,1) n=17	-2,5 (-4,6 - -1,7) (-4,7 - 0,1) n=6	-2,8 (-3,4- -1,4) (-4,3 - -0,2) n=11
BMI (SDS)	-0,3 (-1,6-0,2) (-2,5-3,4) n=20	-0,1(-0,6-0,1) (-2,5-3,4) n=8	-0,4 (-1,8-0,2) (-2,0-2,2)
CC (SDS)	-1,5 (-2,6- -0,6) (-4,4-0,3) n=10	-1,1 (-2,2- -0,9) (-2,6 - -0,9) n=3	-1,8 (-2,7- -0,6) (-4,4-0,3) n=7
Tanner (n, %)	1 (17, 77,3%) 2 (2, 9,1%) 3 (2, 9,1%) 4 (1, 4,5%)	1 (10, 100%)	1 (7, 58,3%) 2 (2, 16,7%) 3 (2, 16,7%) 4 (1, 8,3%)
IGF 1 (SDS)	-1,5 (-2,0- -0,8) (-3,3-0,4) n=14	-1,5 (-1,8 - -0,9) (-2,1 - -0,4) n=5	-1,5 (-2,2 - -0,8) (-3,3 - 0,4) n=9
Rx carpo (anni)**	3,4 (2,1-9,1) (0,10-13,0) n=11	2,0 (0,5-3,4) (0,10-6,0) n=5	8,2 (3,4-11,6) (3,2-13,0) n=6
Δ TBS-GEN (anni)	1,9 (1,2-4,9) (0,2-7,7) n=17	1,9 (1,2-4,9) (0,6-6,1) n=9	2,0 (1,0-4,8) (0,2-7,7) n=8

* p=0,08 (tra GHD si/no), **p=0,02 (in grassetto trend di significatività); CC= circonferenza cranica; Δ TBS-GEN=Intervallo prima valutazione -diagnosi genetica (anni)

In generale soggetti con futuro GHD erano più giovani, impuberi e più bassi (ma con Δ dal TG simile) rispetto ai non GHD alla prima valutazione; i due gruppi non si differenziavano per BMI SDS, IGF-1 e intervallo temporale tra presa in carico e diagnosi molecolare.

In dettaglio: i 22 pazienti in studio (11 Maschi, 11 Femmine) sono stati valutati per la prima volta presso l'istituto G. Gaslini ad un'età mediana di 4,1 anni (range: 0,4-14,3 anni). In particolare, pazienti che saranno poi diagnosticati come affetti da deficit di GH (GHD, n=10) sono stati valutati ad una età tendenzialmente più giovane rispetto a quelli non affetti (Non GHD, n=12), $p=0,08$. (Tabella 11)

La diagnosi molecolare di sindrome di Noonan è stata effettuata ad un intervallo mediano dalla prima valutazione pari a 1,9 anni (range: 0,2-7,7 anni), simile in entrambi i gruppi.

La mediana per la statura espressa in SDS era pari a -2,4 SDS (range: -4,2- -1,2 SDS) con un valore mediano tendenzialmente più basso nei futuri GHD rispetto ai non GHD (mediana: -3,0 vs -2,2 SDS, $p=0,08$).

Questi pazienti avevano una mediana di indice di massa corporea espresso come SDS (BMI SDS) pari a -0,3 SDS (range: -2,5-3,4) e un peso ugualmente espresso in SDS pari a -2,8 SDS (range: -4,7-0,1), senza differenze significative tra i due gruppi.

La circonferenza cranica espressa in SDS aveva un valore mediano pari a -1,5 SDS (range: -4,4-0,4) tenendo però presente la scarsità di dati in possesso (CC n tot=10 vs coorte tot n=22)

Per quanto riguarda lo sviluppo puberale, i pazienti con futura diagnosi di GHD sono stati tutti valutati allo stadio 1 di Tanner, a conferma della tempistica più precoce di valutazione al baseline. Al contrario, i pazienti non GHD avevano la maggior parte uno stadio 1 di Tanner (n=7) e i restanti avevano uno stadio 2 (n=2),3 (n=2),4 (n=1) di Tanner.

Infine, dal punto di vista biochimico sono state dosate le IGF-1 in cui è stata riscontrata una mediana pari a 1,5 (range: -3,3-0,4) mentre dal punto di vista radiologico è stata effettuata una radiografia del carpo in cui si è evidenziata una età ossea mediana pari a 3,4 anni (range: 0,10-13,0 anni), senza differenze significative in entrambi i gruppi per questi due parametri.

6.3. Andamento dell'antropometria, delle IGF-1 e dell'età ossea nel tempo, dalla nascita all'ultimo controllo (T5): confronto tra i pazienti GHD e non GHD.

1) VALUTAZIONE ALLA NASCITA:

	Totale n=22	Futuro GHD n=10	Non GHD n=12
Peso SDS	0,1 (-0,8-1,4) (-2,6-2,3) n=21	0,0 (-0,7-1,5) (-2,6-2,3)	0,1 (-1,4-1,3) (-2,6-1,6) n=11
Lunghezza SDS	-0,1 (-1,5-0,3) (-2,4-1,4) n=20	-0,8 (-1,1-0,4) (-2,0-1,4)	0,0 (-1,9-0,2) (-2,4-1,0) n=10
CC SDS	0,2 (-0,8-1,4) (-1,8-2,8) n=13	0,2 (-0,5-1,1) (-1,0-1,6) n=7	0,3 (-1,4-1,5) (-1,8-2,8) n=6
EG (settimane)	37,0 (35,8-38,3) (33,0-40,0) n=21	37,0 (35,0-39,0) (35,0-40,0)	37,0 (37,0-38,0) (33,0-40,0) n=11

Tabella 12: valutazione antropometrica alla nascita, confronto tra pazienti futuri GHD e non GHD. Test non parametrici: mediana (IQR) (Min-Max); CC= circonferenza cranica, EG= età gestazionale.

Dall'anamnesi fisiologica dei 22 pazienti in studio è emersa una età gestazionale mediana pari a 37 settimane (range: 33,0-40,0), evidenziando dunque in media una gravidanza a termine.

Nell'ambito dei parametri auxologici (peso, lunghezza e circonferenza cranica) alla nascita espressi tutti in SDS non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i due gruppi analizzati (GHD vs non GHD).

Nello specifico, nella coorte in toto è emersa una mediana pari a: 0,1 SDS per il peso (range: -2,6-2,3 SDS), -0,1 SDS (range: -2,4-1,4 SDS) per la lunghezza e 0,2 SDS (range: -1,8-2,8 SDS) per la circonferenza cranica. Tutti e tre i parametri analizzati rientrano nel range di normalità.

2) VALUTAZIONE ANTROPOMETRICA NEL TEMPO NEI 10 PAZIENTI CON NS E GH :

	T0 n=10	T1 n=7*	T2 n=8^	T3 n=6**	T4 n= 6^^	T5 solo GH in corso n=8 ~	T5 n=10
Età (anni)	5,0 (2,6-8,3) (0,9-9,4)	3,7 (2,2-8,0) (1,5-10,0)	5,0 (3,1-7,9) (2,0-10,7)	6,5 (4,6-10,2) (3,0-11,4)	12,1 (9,9-14,7) (9,4-16,6)	13,4 (5,8-18,1) (2,7-18,5)	12,2 (7,3-17,9) (2,7-18,5)
ΔT0-TBS (anni)	0,7 (0,6-2,7) (0,0-4,5)						
Target heigh SDS	-1,0 (-1,2 - -0,6) (-1,8-1,0)						
Statura SDS	-3,0 (-3,5 - -2,4) (-4,0 - -2,0)	-3,0 (-3,4- -2,2) (-4,4- -0,9)	-2,4 (-3,0- -2,0) (-3,8- -1,4)	-2,4 (-3,0- -2,0) (-3,9- -1,8)	-2,5 (-4,3- -2,1) (-4,4- -1,9)	-2,7 (-3,2- -1,6) (-3,7- -0,4)	-3,1 (-3,4- -1,7) (-5,2- -0,4)
VC SDS	-1 (-1,3 - -0,6) (-2,2 - 2,7) n=9	-0,2 (-0,9- 0,6) (-1- 0,7)	0,8 (-0,2- 2,0) (-2,0 - 6,2)	-0,4 (-1,2-0,0) (-1,8-0,1)	-0,8 (-1,7-1,8) (-2,4-3,8)	-1,0 (-2,8-1,2) (-5,3-1,9)	-1,0 (-2,0-1,5) (-3,5-5,3)
Peso SDS	-2,4 (-3,7- -1,7) (-4,5 - -1,0)	-2,4 (-4,3- -1,8) (-4,6- -0,7) n=6	-2,5 (-3,6- -1,8) (-4,5- -1,2)	-2,6 (-3,2- -2,1) (-4,1- -1,5)	-2,1 (-3,6- -1,9) (-4,3- -1,6)	-2,0 (-2,7- -1,5) (-6,0- -0,6)	-2,3 (-3,4- -1,8) (-6,0- -0,6)
BMI SDS	-0,3 (-1,4-0,1) (-3,6- 0,6)	-0,2 (-1,8- 0,1) (-1,9- 1,1)	-0,5 (-1,3- -0,3) (-1,7- 0,3)	-0,5 (-0,8- -0,4) (-2,0- -0,3)	-0,7 (-0,8- -0,4) (-2,7-0,0)	-0,6 (-0,9- -0,1) (-3,1-0,5)	-0,6 (-0,9- -0,1) (-3,1-0,5)
CC SDS	-1,1 (-1,8- -0,7) (-2,7 - -0,3) n=5	-1,2 (-2,2- -0,5) (-2,5- -0,3) n=3	0,5 (-1,1-1,6) (-1,8-1,7) n=4	-0,2 (-2,0-1,5) (-2,7-1,7) n=5	0,5 (-0,3-2,2) (-0,5-2,8) n=3	-0,1 (-1,0-0,3) (-1,7-2,7) n=6	-0,4 (-1,5-0,3) (-2,7-2,7) n=7
Guadagno staturale SDS	-----	0,0 (-0,0- 0,1) (-0,5 - 1,1)	0,4 (0,3-0,6) (-0,5-0,8)	0,0 (-0,1-0,1) (-0,1-0,3)	-0,3 (-0,4- -0,1) (-0,4-0,6)	-0,1 (-0,7-0,9) (-1,1-1,5)	-0,4 (-0,8-0,6) (-1,1-1,5)
ΔT5/T4-T0	-----	-----	-----	-----	-0,2 (-0,4-0,5) (-0,4-1,0)	0,6 (0,0-0,8) (-0,2-1,6)	0,5(-0,0-0,8) (-0,2-1,6)
Tanner	1 (10, 100%)	1 (7, 100%)	1 (8,100%)	1 (6, 100%)	2 (6, 100%)	1 (3, 37,5%) 3 (2, 25%) 4 (3, 37,5%)	1 (4, 40%) 2 (1, 10%) 3 (2, 20%) 4 (3, 30%)
IGF 1 SDS	-1,5 (-2,6- -0,9) (-3,5- 0,0)	-1,4 (-2,2-0,4) (-2,8- 2,8) n=6	-0,8 (-1,5- 1,2) (-3,5-2,8)	-0,9 (-2,4-0,2) (-2,5- 1,0)	0,1 (-1,3-0,7) (-3,2-0,9)	0,1 (-0,6-0,3) (-3,1-2,8)	0,1 (-1,1-0,2) (-3,1-2,8) n=9
Rx carpo (anni)	3,0 (1,3-5,3) (0,6-6,1) n=7	-----	3,0 (1,9-5,5) (1,4-8,0) n=5	4,1 (2,7-6,3) (1,4-8,3)	9,6 (8,6-12,1) (5,7-13,6)	12,1 (1,7-14,5) (1,4-15,8) n=5	8,0 (1,8-14,0) (1,4-15,8) n=6
Anni di terapia	-----	-----	-----	-----	5,1 (4,3-6,7) (0,2-7,5)	6,7 (2,9-8,0) (1,4-10,9)	4,4 (2,0-7,9) (0,2-10,9)
Dose rhGH (mg/kg/die)	0,029 (0,026- 0,029) (0,020-0,060)	0,028(0,026- 0,028) (0,019-0,033) n=8	0,026(0,023-0,026) (0,015-0,036) n=8	0,031 (0,028-0,031) (0,027-0,045) n=5	0,029 (0,028- 0,029) (0,028-0,045) n=5	0,029 (0,027-0,029) (0,015-0,043) n=8	

Tabella 13: Andamento antropometrico, biochimico e radiologico nel tempo: T0 (valutazione prima dell'inizio della terapia). Test non parametrici: mediana, (IQR), (Min-Max). T0: valutazione pre-GH, T1: +6 mesi di terapia, T2: +12 mesi, T3: +24 mesi, T4: stadio G2/B2, T5: ultimo follow-up, ΔT0-TBS: Intervallo tra presa in carico e inizio GH, CC: circonferenza cranica, ΔT5/T4-T0: guadagno staturale da inizio GH ad ultima visita/avvio puberale.

***3 drop-out in merito a:**

- A. interrompe GH per sempre per sviluppo di crisi convulsive;
- B. e C. mancano i dati perché seguiti presso altra sede.

^1 rientra:

- B. inizia ad essere seguito presso l'istituto G. Gaslini.

**** 2 drop out in merito a:**

- D. stop follow up;
- B. stop GH per 16 mesi causa aumento diametro DNET.

^^:

- E. e F. drop-out per mancato raggiungimento G2/B2;
- A. e C. rientrano per raggiungimento G2/B2 .

~ (al T4 n=5 erano attualmente in terapia, n=1 lo aveva sospeso):

- D. rientra perché ha sempre fatto GH durante il follow-up;
- E. rientra perché non aveva raggiunto G2/B2 ma ha sempre continuato a fare rhGH;
- B. rientra perché dopo l'interruzione di 16 mesi ha ripreso a fare rhGH fino all'ultimo controllo.

Il deficit di GH è stato diagnosticato mediante la misurazione di un picco di GH <8 ng/ml all'esecuzione di due test da stimolo. I test eseguiti nella nostra coorte sono stati: test da stimolo con Arginina (n=10) più test da stimolo con glucagone (n=8) o insulina (n=1) o clonidina (n=1). Tutti i pazienti diagnosticati hanno iniziato un trattamento con ormone della crescita, alcuni poi lo hanno interrotto per qualche tempo o lo hanno sospeso per un tempo indeterminato a causa o della scarsa risposta alla terapia (n=3) o per lo sviluppo di reazione avverse. A tal proposito, all'interno delle reazioni sviluppate che hanno portato alla interruzione della terapia si sono riscontrate: un caso di polisierositi, un caso di reazione pomfoide, un caso di crisi convulsive ed infine un caso di aumento di dimensioni di una lesione neoplastica (DNET).

Nei 10 pazienti analizzati (Maschi n=2, Femmine n=8) con GHD è stata registrata una mediana di intervallo tra la presa in carico (baseline) dei pazienti e l'inizio della terapia (T0) pari a 0,7 anni (range: 0,0-4,5 anni). (Tabella 13)

L'età mediana al T0 (prima dell'inizio della terapia con GH) (n=10) era pari a 5,0 anni (range: 0,9-9,4 anni) per arrivare al T5 (ultimo controllo) (n=10) ad una età mediana pari a 12,2 anni (range: 2,7-18,2 anni). In particolare, al T5 solo 8 pazienti su 10 erano ancora in terapia con GH, gli altri 2 invece avevano interrotto la terapia poiché un bambino era risultato poor responder (stop GH dopo circa un anno di terapia causa guadagno staturale

pari solamente a 0,4 SDS) e un altro aveva sviluppato crisi convulsive dopo 2 mesi dall'inizio della terapia. Questi 8 pazienti in terapia al T5 avevano un'età mediana pari a 13,4 anni (range: 2,7-18,5 anni).

Dal punto di vista staturale, il valore di altezza mediana SDS si mantiene patologico (cioè al di sotto di -2 SDS) a tutti i controlli effettuati.

In particolare, al T0 i 10 pazienti valutati avevano una mediana pari a -3,0 SDS (range: -4,0- -2,0 SDS) che però non tende a migliorare all'ultimo controllo (T5) dove la mediana rimane pari a -3,1 SDS (range: -5,2- -0,4). Osservando però gli 8 pazienti ancora in terapia all'ultimo controllo si evidenzia un lieve miglioramento (mediana -2,7 SDS, range: -3,7- -0,4) tenendo comunque presente che vi è un numero pari a due pazienti in meno rispetto al T5. Gli unici momenti di leggero miglioramento, se pur rimanendo comunque con un valore di statura mediana patologico, sono stati registrati a T2 (dopo un anno di terapia), a T3 (dopo due anni di terapia) e a T4 (all'avvio puberale), tenendo sempre presente la variazione di riduzione numerica presente a questi controlli.

Medesima osservazione si ripresenta per la velocità di crescita espressa in SDS che anzi rimane stabile ad un valore di mediana pari a -1 SDS al T0 e al T5.

Sulla base di tutto ciò che è stato precedentemente descritto, abbiamo registrato una mediana di guadagno staturale totale, calcolato dal primo all'ultimo controllo, pari a 0,5 SDS (range: -0,2-1,6) per tutti i 10 pazienti e pari a 0,6 SDS per gli otto pazienti rimasti in terapia fino all'ultimo.

Differente è invece l'andamento del dosaggio delle IGF-1 dove si osserva un passaggio da una mediana pari a -1,5 SDS al T0 (range: -3,5-0,0 SDS) ad un valore pari a 0,1 SDS (range: -3,1-2,8 SDS) all'ultimo controllo. Inoltre, si è sempre osservato un trend di miglioramento durante tutti i vari controlli effettuati. Medesimo andamento è stato registrato per la valutazione dell'età ossea.

Per quanto riguarda invece il peso in SDS rimane abbastanza stabile durante tutti i controlli effettuati arrivando ad ottenere un miglioramento della mediana pari solamente a 0,1 SDS tra il primo e l'ultimo controllo. Invece, per gli otto pazienti ancora in terapia al T5 si è registrato un guadagno pari a 0,4 SDS.

Differente è la variazione di mediana del BMI espresso in SDS dove si è osservato un peggioramento tra il primo (mediana= -0,3 SDS, range -3,6-0,6) e l'ultimo controllo (mediana= -0,6 SDS, range: -3,1-0,5) anche nei pazienti rimasti in terapia al T5. In particolare, si è registrata una perdita pari a 0,3 SDS.

Infine, in merito allo stadio di Tanner, al T0 tutti erano in stadio 1 quindi prepuberi per arrivare poi al T5 con quattro pazienti allo stadio di Tanner 1, un paziente allo stadio 2, due allo stadio 3 e tre allo stadio 4 di Tanner.

In merito alla terapia, sono stati effettuati in mediana 4,4 anni di terapia totale (range: 0,2-10,9 anni). Questo numero sale, diventando pari a 6,7 anni (range: 1,4-10,9 anni) se consideriamo solamente gli otto pazienti arrivati ancora in terapia al T5. Per quanto riguarda la dose espressa in mg/kg/die utilizzata, è stato registrato un dosaggio mediano abbastanza costante durante tutto il follow-up pari a 0,029 mg/kg/die con degli aumenti registrati solo ad un anno e a due anni dall'inizio della terapia.

3) VALUTAZIONE ANTROPOMETRICA NEL TEMPO NEI PAZIENTI CON NS NON AFFETTI DA GHD:

	Valutazione BASE LINE n=12	Valutazione G2/B2 (T4) n=2	Valutazione ultimo controllo (T5) n=12
Età (anni)	4,7 (2,8-12,3) (0,9-14,3)	12,2 (11,7-12,7) (11,7-12,7)	11,3 (7,8-14,9) (2,3-18,1)
Statura SDS	-2,2 (-2,7 - -1,4) (-4,2 - -1,2)	-1,2 (-1,7- -0,7) (-1,7- -0,7)	-1,9 (-2,9- -1,7) (-4,2- -0,8)
Target height SDS	-0,3 (-1,5 - 0,3) (-2,0-1,6) n=11		-----
VC SDS	-----	-0,6 (-1,1- -0,1) (-1,1- -0,1)	-1,0 (-1,7- -0,3) (-3,2-3,7) n=11
Peso SDS	-2,8 (-3,4 - -1,4) (-4,3 - -0,2) n=11	-2,0 (-2,7- -1,8) (-2,7- -1,8)	-2,0 (-2,4- -1,1) (-4,3-0,1)
BMI SDS	-0,4 (-1,8 - 0,2) (-2,0- -2,2)	-1,8 (-1,8- -1,7) (-1,8- -1,7)	-0,1 (-1,9-0,5) (-2,2-1,6)
CC SDS	-1,8 (-2,6 - -0,6) (-4,4 - 0,3) n=7		0,5 (-2,5- 1,1) (-3,3-3,1) n=7
$\Delta T5-T0$ SDS	-----	0,1 (-0,3-0,5) (-0,3-0,5)	0,0 (-0,3-0,4) (-1,4-0,9)
Tanner (n, %)	1 (7, 58,3 %) 2 (2, 16,7%) 3 (2, 16,7%) 4 (1, 8,3%)	2 (2, 100%)	1 (6, 50,0 %) 2 (1, 8,3%) 3 (1, 8,3%) 4 (2, 16,7%) 5 (2, 16,7%)
IGF 1 SDS	-1,5 (-2,2 - -0,8) (-3,3 - 0,4) n=9	-1,7 (-3,0- -0,4) (-3,0- -0,4)	-1,5 (-3,2- -0,9) (-3,8-0,5) n=9
Rx carpo (anni)	8,2 (3,4-11,6) (3,2-13,0) n=6	10,0 (8,8-11,1) (8,8-11,1)	8,8 (6,7-13,3) (4,6-17,4) n=9
Durata follow-up (anni)			4,5 (2,0-5,7) (0,3-8,0)

Tabella 14: Andamento antropometrico, biochimico e radiologico nei pazienti con NS non affetti da GHD. CC: circonferenza cranica, $\Delta T5-T0$ SDS: guadagno staturale totale.

Come evidenziato nella Tabella 15, 12 pazienti non affetti da GHD (Maschi n=9, Femmine n=3) sono stati valutati per la prima volta ad un'età mediana pari a 4,7 anni (range: 0,9-14,3 anni) arrivando all'ultimo controllo ad avere una mediana d'età pari a 11,3 anni (range: 2,3-18,1 anni). La durata mediana del follow-up risulta essere pari a 4,5 anni (0,3-8,0 anni)

Al primo controllo la mediana di statura era pari a -2,2 SDS (range: -4,2- -1,2 SDS), discostandosi di solo 0,2 SDS dal valore di statura non patologico. L'andamento staturale tende a migliorare col tempo arrivando all'ultimo controllo ad avere una mediana pari a -1,9 SDS (range: -4,2- -0,8), rientrando dunque nel range di normalità. La velocità di crescita espressa in SDS misurata all'ultima controllo aveva una mediana pari a -1,0 SDS (range: -3,2-3,7 SDS) e il guadagno staturale totale al T5 era pari in mediana a 0,0 SDS (range: -1,4-0,9 SDS).

Il quadro biochimico del dosaggio delle IGF-1 è rimasto stabile dal primo all'ultimo controllo, rimanendo pari a -1,5 SDS di mediana. L'età ossea, al contrario, ha subito un lieve incremento nella mediana passando da 8,2 anni a 8,8 anni, tenendo però presente il numero ridotto di dati a disposizione.

Per quanto riguarda invece il peso e il BMI espressi entrambi in SDS si è osservato un miglioramento in tutte e due i casi dal primo all'ultimo controllo. In particolare, si partiva da una mediana pari a -2,8 SDS (range: -4,3- -0,2) per il peso e -0,4 SDS (range: -2,0- -2,2 SDS) per il BMI per arrivare all'ultimo controllo ad una mediana pari a -2,0 SDS (range: -4,3-0,1) per il peso e -0,1 SDS (range: -2,2-1,6 SDS) per il BMI.

Infine, per quanto riguarda lo stadio puberale, il quadro è risultato essere molto più eterogeneo rispetto ai pazienti con GHD, registrando casi di stadio di Tanner sopra 1 sin dal primo controllo. In particolare, al T0 sono stati registrati sette casi di stadio 1 di Tanner, due casi di stadio 2, due casi di stadio 3 ed infine 1 caso di stadio 4. All'ultimo controllo però, pazienti in stadio 1 di Tanner sono rimasti comunque numerosi (n=6), aggiungendo due casi in stadio puberale finale ovvero stadio 5 di Tanner.

4) CONFRONTO ANTROPOMETRICO E BIOCHIMICO TRA I PAZIENTI GHD E NON GHD:

Tabella 15: valutazione antropometrica nel tempo: GHD vs NON GHD

	Baseline/inizio GH			Avvio puberale			Ultimo controllo		
	Totale T0 n=22	T0 GHD n=10	T0 non GHD n=12	Totale n=8	T4 n=6	T4 non GHD n=2	Totale T5 n=22	T5 GHD in tp n=8	T5 non in tp n=14
Età (anni)	4,8 (2,6-8,5) (0,9-14,3)	5,0 (2,6-8,3) (0,9-9,4)	4,7 (2,8-12,3) (0,9-14,3)	12,2(10,2-14,2) (9,4-16,6)	12,1 (9,9-14,6) (9,4-16,6)	12,2(11,7-12,7) (11,7-12,7)	11,8 (7,5-15,2) (2,3-18,5)	13,4 (5,8-18,1) (2,7-18,5)	11,0 (7,5-14,6) (2,3-18,2)
Statura (SDS)	-2,6 (-3,1- -2,0) (-4,2- 1,2)	-3,0 (-3,5- -2,4) (-4,0- 2,0)	-2,2 (-2,7- -1,4) (-4,2- 1,2)*	-2,2 (-3,6- 1,8) (-4,4- -0,7)	-2,5 (-4,3- 2,1) (-4,4- 1,9)	-1,2 (-1,7- 0,7) (-1,7- 0,7)**	-2,2 (-3,2- 3,2) (-5,2- 0,4)	-2,7 (-3,2- -1,6) (-3,7- -0,4)	-2,0 (-3,4- -1,7) (-5,2- 0,8)
Target height (SDS)	-0,7 (-1,4- -2,0) (-2,0- 1,6) n=21	-1,0 (-1,2- -0,6) (-1,8- 1,0)	-0,3 (-1,5- -0,3) (-2,0-1,6) n=11	-0,9 (-1,1- 0,2) (-1,6-1,6)	-1,0 (-1,2- 0,7) (-1,6- 0,1)	0,7 (-0,3- 1,6) (-0,3-1,6)	-0,7 (-1,0- 1,4) (-2,0- 1,6) n=21	-1,0 (-1,2- -0,7) (-1,6-1,0)	-0,3 (-1,6- 0,2) (-2,0-1,6) n=13
Tanner (n,%)	1 (17,77,3%) 2 (2,9,1%) 3 (2,9,1%) 4 (1,4,5%)	1 (10,100%)	1 (7,58,3%) 2 (2,16,7%) 3 (2,16,7%) 4 (1,8,3%)				1 (10,45,5%) 2 (2,9,1%) 3 (3,13,6%) 4 (5,22,7%) 5 (2,9,1%)	1 (3,37,5%) 3 (2,25%) 4 (3,37,5%)	1 (7,50%) 2 (2,14,3%) 3 (1,7,1%) 4 (2,14,3%) 5 (2,14,3%)
ΔT5-T0							0,2 (-0,1-0,6) (-1,4-1,6)	0,6 (0,0-0,8) (-0,2-1,6)	0,0 (-0,3-0,3) (-1,4-0,9) ^
BMI SDS	-0,4 (-1,6-0,1) (-3,6- 2,2) n=20	-0,3 (-1,4-0,1) (-3,6- 0,6)	-0,4 (-1,8- -0,2) (-2,0- 2,2)	-0,8 (-1,8- 0,5) (-2,7- -0,0)	-0,7 (-0,8- 0,4) (-2,7- 0,0) n=6	-1,8 (-1,8- 1,7) (-1,8- -1,7) n=2	-0,5 (-1,1-0,3) (-3,1- 1,6)	-0,6 (-0,9- -0,1) (-3,1-0,5)	-0,5 (-1,8- 0,5) (-2,2-1,6)
IGF-1 SDS	-1,5 (-2,5- -0,8) (-3,5- 0,4) n=19	-1,5 (-2,6- -0,9) (-3,5- 0,0)	-1,5 (-2,2- -0,8) (-3,3- 0,4) n=9	-0,4 (-2,6- 0,7) (-3,2-0,9)	0,1 (-1,3-0,7) (-3,2- 0,9)	-1,7 (-3,0- 0,4) (-3,0- -0,4)	-1,1 (-3,0- 0,1) (-3,8- 2,8) n=18	0,1 (-1,1-0,2) (-3,1-2,8) n=8	-1,5 (-3,2- -0,9) (-3,8- 0,5)^^^ n=10

*p=0,04, **p<0,05, ^p=0,08, ^^p=0,03 (in grassetto trend di significatività)

Suddividendo la nostra coorte in due gruppi (pazienti con GHD (n=10) e pazienti senza GHD (n=12)) e confrontandoli poi a varie tempistiche (T0, T4 e T5) sono emerse alcune differenze statisticamente significative.

In particolare, al T0 che corrisponde alla prima visita per i pazienti non GHD e alla visita che precede l'inizio della terapia per i pazienti GHD, si osserva una differenza significativa ($p=0,04$) per il valore di statura espresso in SDS (Tabella 16). Ciò, dunque, sta ad indicare che i bambini affetti da NS e GHD avevano una statura espressa in SDS inferiore rispetto a quelli senza GHD nonostante avessero una età mediana di presentazione al T0 simile. Tra i due gruppi, infatti, sussiste una differenza di statura pari a 0,8 SDS.

Al T4 (avvio puberale: G2/B2), possiamo affermare che la differenza significativa tra i due gruppi osservato al T0 continua a mantenersi ($p<0,05$), tenendo però in considerazione la scarsa numerosità dei pazienti non GHD (n=2), (Tabella 17). Infatti, i pazienti con GHD continuano ad avere una mediana staturale in SDS decisamente inferiore rispetto ai pazienti non GHD, registrando una differenza pari a 1,3 SDS tra i due gruppi. Questa differenza numerica di pazienti tra i due gruppi è determinata dalla diversità dello stadio puberale esistente al T0. Infatti, mentre tra i pazienti con GHD il 100% di loro partiva da uno stadio 1 di Tanner al T0, tra i pazienti non GHD vi era una maggiore eterogeneità. In particolare, un gruppo di essi (n=5) si era presentato alla prima visita con pubertà già avviata, un altro (n= 6) rimane in stadio 1 di Tanner fino all'ultimo controllo e solo due raggiungono l'avvio puberale.

All'ultimo controllo (T5) abbiamo invece confrontato due gruppi leggermente diversi, ovvero un gruppo costituito dai pazienti GHD rimasti sempre in terapia con GH (anni di terapia totali: 6,7 anni (range 1,4-10,9) e un altro gruppo contenente sia i pazienti non GHD e sia quelli precedentemente diagnosticati come GHD ma non più in terapia perché o risultati poor responder o per sviluppo di sintomi (non necessariamente reazioni avverse al rhGH). Ciò è stato effettuato con l'obiettivo di evidenziare eventuali effetti positivi del GH in termini staturali. Da come è evidenziato nella Tabella 16, in termini staturali non vi sono differenze statisticamente significative tra questi due gruppi: in particolare, i pazienti GHD ancora in terapia hanno registrato una mediana staturale pari a $-2,7$ SDS (range: $-3,7$ - $-0,4$ SDS), mantenendosi dunque al di sotto del range di normalità. I pazienti non in trattamento con GH hanno registrato invece una mediana staturale pari a $-2,0$ SDS (range: $-5,2$ - $-0,8$), mantenendosi al limite del range di normalità. Invece, relativamente al guadagno staturale totale (da T0 a T5) (Fig.16), è emerso un trend di differenza tra i due gruppi ($p=0,08$), evidenziando come i pazienti GHD in terapia ottengano un guadagno

staturale maggiore rispetto ai pazienti non in terapia, nonostante la statura SDS all'ultimo controllo rimanga comunque patologica: 0,6 SDS (range: -0,2-1,6 SDS) vs 0,0 SDS (range: -1,4-0,9 SDS).

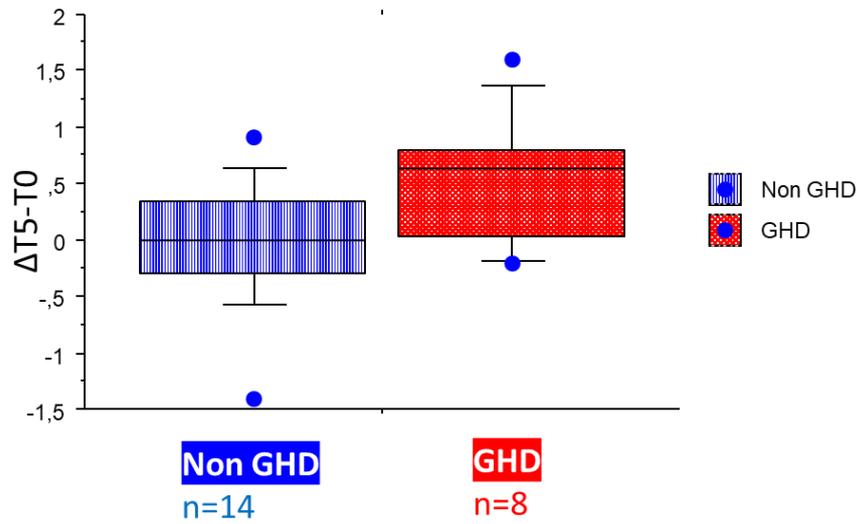


Figura 16: Guadagno staturale totale: GHD in terapia vs pazienti non in terapia

In Fig.17 si rappresenta graficamente l'andamento staturale nel tempo e le relative differenze significative in questi due gruppi analizzati.

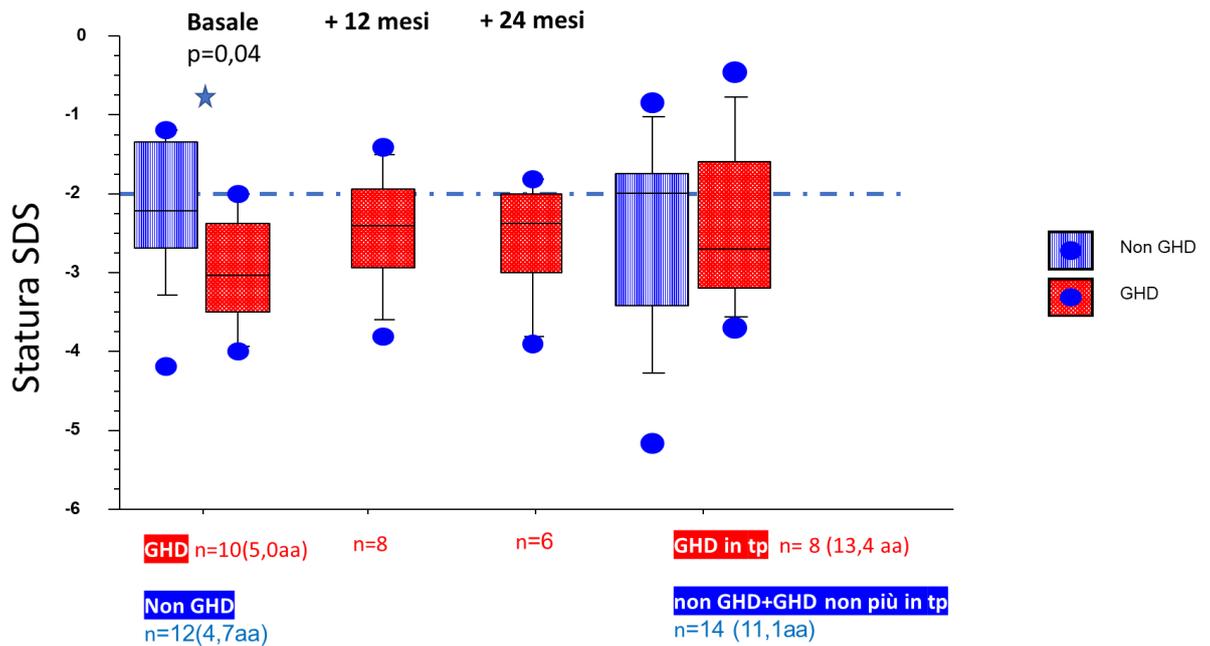


Figura 17: Box plot di andamento staturale nel tempo: da T0, T+6 mesi, T+12 mesi, T5 con e senza GHD

In merito all'andamento del BMI SDS non si evidenziano differenze statisticamente significative tra i due gruppi. I pazienti non GHD partono con un BMI SDS leggermente inferiore rispetto ai GHD al T0 (-0,4 SDS vs -0,3 SDS) per poi però ottenere un guadagno di BMI superiore rispetto ai GHD raggiungendo all'ultimo controllo un BMI di -0,1 SDS vs -0,3 SDS dei GHD. I pazienti GHD invece, tendono ad avere una lieve riduzione di BMI nel tempo per poi raggiungere al T5 lo stesso valore di BMI SDS della prima visita.

Per quanto riguarda l'andamento delle IGF-1, entrambi i gruppi partono con una mediana pari a -1,5 SDS. Successivamente i pazienti GHD mostrano un progressivo rialzo di questo valore durante il follow-up, il che indica una adeguata compliance alla terapia, per assestarsi al T5 ad un valore mediano pari a 0,1 SDS, del tutto nella norma.

I pazienti non GHD tendono invece a mantenere valori costanti nel tempo (mediana= -1,5 SDS). In merito a questo differente andamento biochimico, emerge dunque una differenza statisticamente significativa ($p=0,03$) tra i due gruppi all'ultimo controllo (Fig.18).

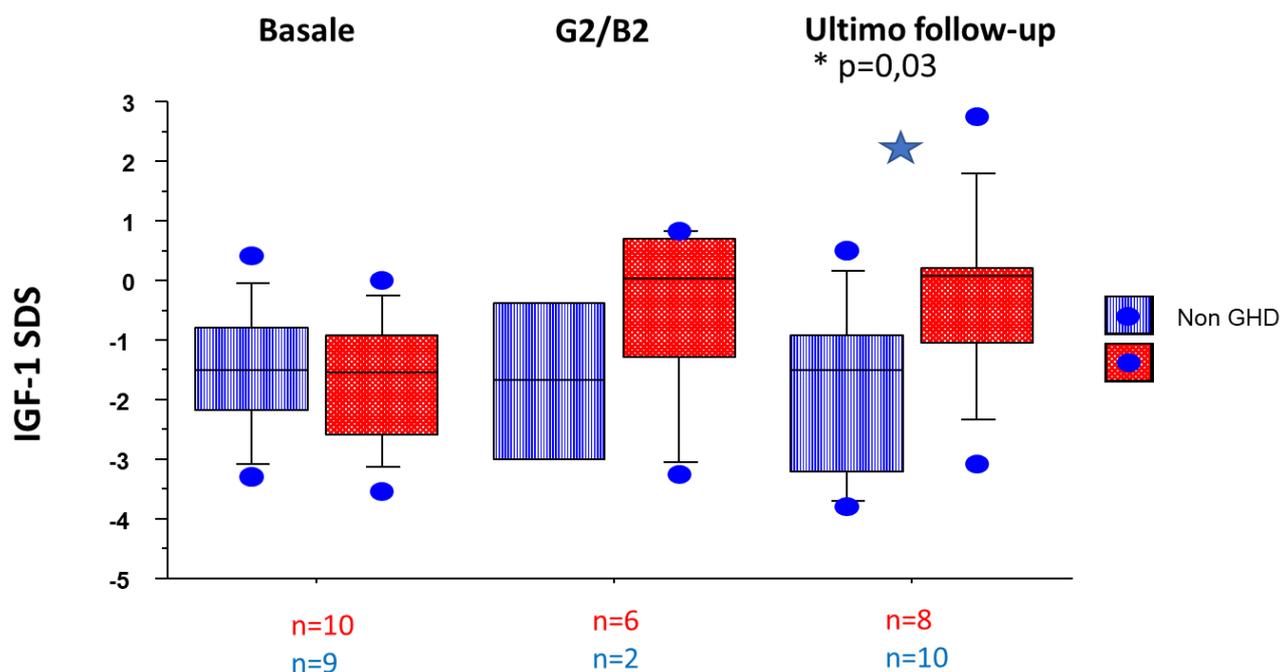


Figura 18: Andamento IGF-1 GHD vs non GHD

Infine, costruendo un modello di analisi multivariata (Tabella 16) è emerso che solo l'altezza basale predice in modo significativo ($p=0,0015$) l'altezza all'ultimo controllo solo per i pazienti non GHD dopo correzione per target genetico e sesso. In particolare, il modello ha un valore di predittività pari al 71% nei non GHD e 39% nei GHD. I valori di IGF-1 non predicono la statura all'ultimo controllo, né le dosi di GH o la durata del trattamento con GH in soggetti trattati.

	β stand.			P value			Adj.R ²		
	TOTALE	GHD	NON GHD	TOTALE	GHD	NON GHD	TOTALE	GHD	NON GHD
Altezza basale	1.157	2.563	1,476	0.0002	.150	.0015	.560	.385	.709
TG	-.103	.101	-.300	0.611	.845	.2197			
Sesso	-.246	2.196	-.754	0.535	.324	.253			

Tabella 16: analisi di regressione multivariata: impatto di altezza basale su statura all'ultimo controllo

6.4 Confronto antropometrico e biochimico tra pazienti con mutazione di PTPN11 e pazienti con altre mutazioni differenti da PTPN11.

	H SDS BS	H SDS T0	H SDS T1	H SDS T2	H SDS T3	H SDS T4	H SDS T5	$\Delta T5-T0$
PTPN11 si	-2,6	-2,6	-3,3	-2,8	-2,5	-0,7	-2,2	0,1
n=12	(-3,0- -1,9)	(-3,0- -1,9)	(-3,5- -3,1)	(-3,0- -2,4)	(-3,0- -2,0)	n=1	(-3,2- -1,8)	(-0,3-0,5)
	(-3,9- -1,2)	(-3,5- -1,2)	(-3,5- -3,1)	(-3,1- -2,3)	(-3,0- -2,0)		(-3,8- -0,8)	(-1,4-0,9)
			n=2	n=3	n=2			
PTPN11 no	-2,4	-2,5	-2,8	-2,2	-2,4	-2,2	-2,4	0,3
n=10	(-4,2- -1,3)	(-3,9- -2,0)	(-3,3- -1,7)	(-2,9- -1,6)	(-3,3- -2,0)	(-3,9- -2,0)	(-3,7- -1,4)	(0,0-0,7)
	(-3,9- -2,0)	(-4,2- -1,3)	(-4,4- -0,9)	(-3,8- -1,4)	(-3,9- -1,8)	(-4,4- -1,8)	(-5,2- -0,4)	(-0,3-1,6)
			n=5	n=5	n=4	n=7		

Tabella 17: altezza SDS ai vari follow-up: PTPN11 vs non PTPN11

In merito all'andamento staturale (Tabella 17), non sussistono differenze statisticamente significative tra i due gruppi. Entrambi mantengono dalla prima all'ultima visita una statura patologica, inferiore alle -2,0 SDS. All'avvio puberale non è stato possibile confrontare i due gruppi a causa della scarsità numerica di pazienti (n=1 per PTPN11 al T4). A tal proposito si mette in evidenza l'andamento accrescitivo di questi due gruppi solo ai tempi basale e all'ultima visita. (Fig. 19)

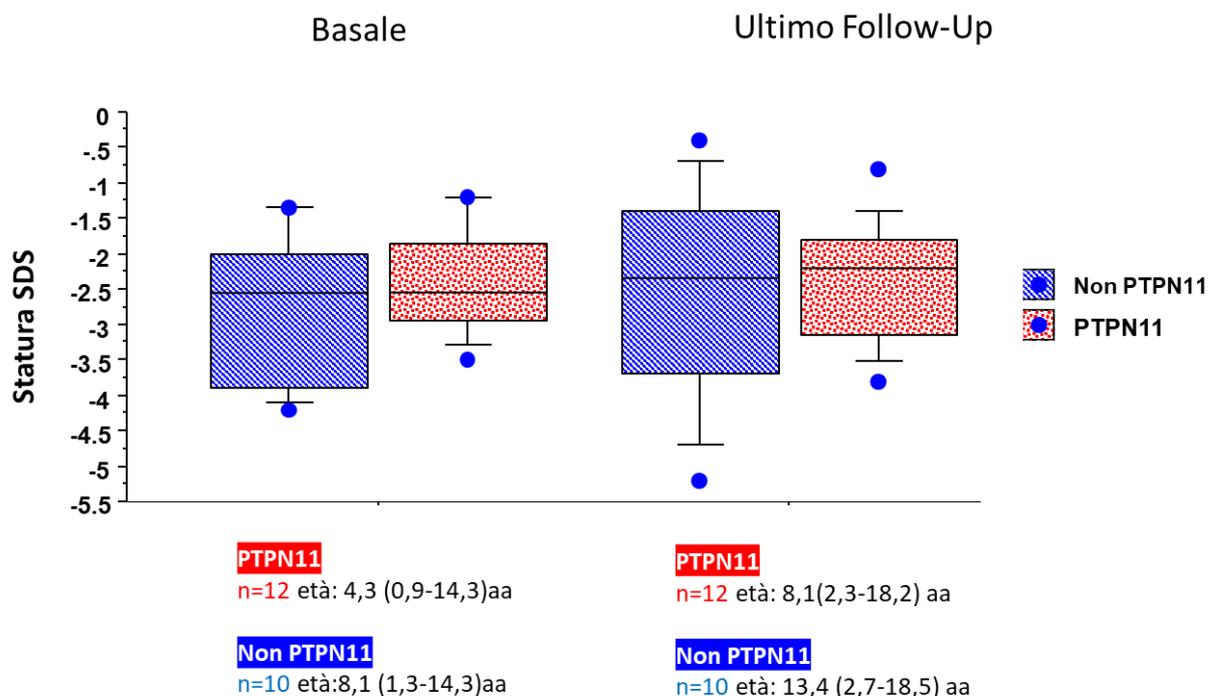


Figura 19: box plot di andamento staturale PTPN11 vs non PTPN11

		BMI SDS T0	BMI SDS T1	BMI SDS T2	BMI SDS T3	BMI SDS T4	BMI SDS T5	Δ BMI SDS T5-T0
PTPN11 si n=12		-0,4	-1,5	-1,1	-0,7	-1,8	-0,1	0,1
		(-1,8-0,1)	(-1,8- -1,2)	(-1,4- -0,5)	(-0,8- -0,5)	n=1	(-0,9-0,5)	(-0,3-0,7)
		(-1,9-2,2)	(-1,8- -1,2)	(-1,5- -0,3)	(-0,8- -0,5)		(-2,2-1,6)	(-0,8-1,2)
		n=10	n=2	n=3	n=2			
PTPN11 no n=10		-0,3	0,1	-0,4	-0,4	-0,8 (-1,6- -	-0,7	-0,5
		(-1,4-0,2)	(-0,6-0,4)	(-0,8- -0,1)	(-1,2- -0,3)	0,8)	(-1,8- -0,1)	(-0,9- -0,1)
		(-3,6-1,2)	(-1,9-1,1)	(-1,7-0,3)	(-2,0- -0,3)	-2,7- -0,4)	(-3,1-0,3)	(-1,7-3,9) *
			n=5	n=5	n=4	n=7		

Tabella 18: BMI SDS ai vari follow-up: PTPN11 vs non PTPN11, *p=0,06

Relativamente al BMI invece (Tabella 18), i due gruppi dimostrano una mediana di BMI SDS simile al primo controllo. Successivamente, i pazienti senza mutazione di PTPN11 dimostrano una progressiva riduzione, fino ad arrivare all'ultima visita ad una mediana di BMI SDS pari a -0,7 SDS, a differenza dei pazienti con mutazione di PTPN11 che dimostrano invece un progressivo lieve incremento del BMI (T5: mediana BMI SDS -0,1 SDS). In merito a ciò che è stato appena descritto dunque, i pazienti con mutazione di PTPN11 dimostrano di raggiungere un maggior guadagno di BMI SDS rispetto ai pazienti senza questa mutazione (p=0,06): 0,1 SDS (range: -0,8-1,2 SDS) vs -0,5 SDS (range: -1,7-3,9 SDS), (Fig. 20). I valori di BMI mediani si mantengono complessivamente normali.

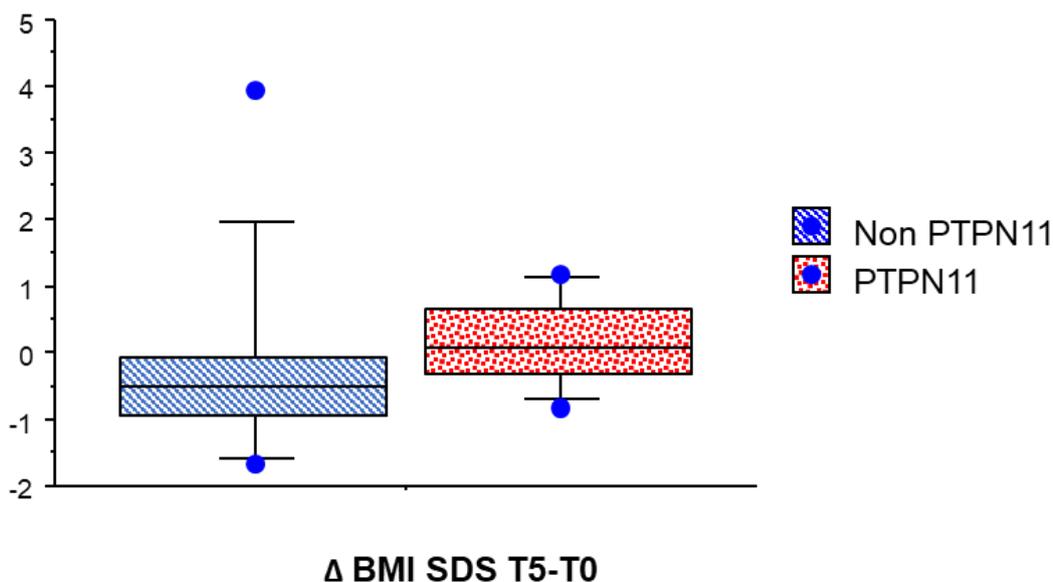


Figura 20: Box plot guadagno BMI SDS PTPN11 vs non PTPN11

		IGF 1 T0	IGF 1 T1	IGF 1 T2	IGF 1 T3	IGF 1 T4	IGF 1 T5
PTPN11	si	-2,0 (-2,9- -1,4) (-3,5-0,4) n=9	-1,9 (-2,2- -1,6) (-2,2- -1,6) n=2	-1,5 (-3,0-0,2) (-3,5-0,7) n=3	-2,5 (-2,5- -2,4) (-2,5- -2,5) n=2	-3,0 n=1	-1,5 (-3,2- -0,7) (-3,8-0,5) n=9
PTPN11	no	-1,2 (-1,7- -0,7) (-2,7-0,0)*	-0,4 (-2,0- -0,4) (-2,8-2,8) n=4	-0,4 (-1,3- 1,9) (-1,6-2,8) n=5	0,2 (-0,9-0,6) (-2,0-1,0) n=4 **	-0,4 (-1,1-0,7) (-3,2-0,9) n=7	-0,1 (-1,3-0,2) (-3,1-2,8) n=9

Tabella 19: IGF-1 SDS ai vari follow-up: PTPN11 vs non PTPN11, *p=0,08, **p=0,06

Infine, in merito all'andamento delle IGF-1, si evidenzia una iniziale differenza al primo controllo: -2,0 SDS (range: -3,5-0,4) per i PTPN11 vs -1,2 SDS (range: -2,7-0,0 SDS), p=0,08. Successivamente i pazienti senza mutazioni di PTPN11 tendono ad avere un aumento nel tempo dei valori di IGF-1, raggiungendo all'ultimo controllo una mediana pari a -0,1 SDS (range: -3,1-2,8) vs -1,5 SDS (-3,8-0,5 SDS) dei PTPN11. Questo è da interpretare soprattutto in relazione al fatto che i pazienti senza mutazione di PTPN11 sono in maggior numero sottoposti alla terapia con GH (n=7) e ciò ne determina un aumento, mentre tra i pazienti PTPN11 solo 3 fanno terapia con GH. Per sottolineare queste differenze appena descritte è esplicativo il box plot che pone in evidenza i diversi valori di IGF-1 al primo e all'ultimo controllo (Fig. 21).

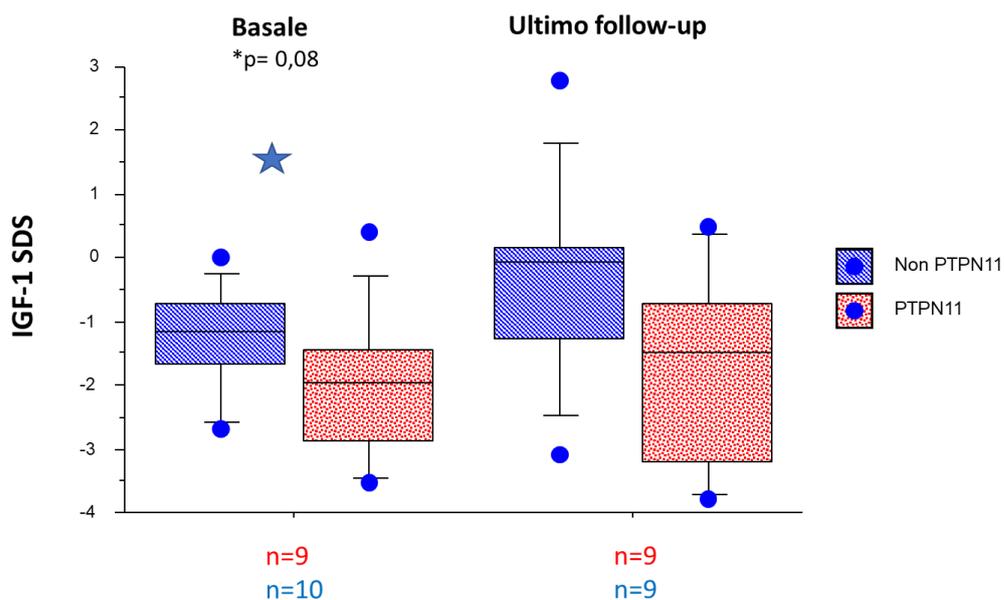


Figura 21: confronto valori IGF-1 al primo e all'ultimo controllo in PTPN11 vs non PTPN11

6.5 Descrizione dell'attivazione Ipotalamo-Ipofisi-Gonadi: confronto tra sesso maschile e sesso femminile.

L'avvio puberale documentato dal punto di vista clinico, corrispondente allo stadio B2 per le femmine e G2 per i maschi, si è verificato in 8 pazienti su 22 totali. N=4 pazienti avevano già presentato un avvio puberale alla prima visita e quindi non erano inseribili nell'analisi, mentre n=10 pazienti si trovano attualmente in stadio prepubere. Di questi 8 pazienti n=3 erano maschi (portatori di mutazioni SHOC-2, PTPN11, KRAS) di cui n=1 in terapia con GH da circa 5 anni, mentre n=5 erano femmine (portatrici di mutazioni: KRAS (n=2), BRAF (n=2), SOS1 (n=1)), tutte in terapia con GH per una durata mediana pari a 5,1 anni (range:0,2-7,5 anni).

L'avvio puberale è avvenuto ad una età mediana totale pari a 12,2 anni (range: 9,4-16,5 anni), più precocemente nelle femmine rispetto ai maschi: 10,5 anni (range:9,4-16,6 anni) vs 12,7 anni (range: 11,7-13,7 anni). In generale questo è avvenuto spontaneamente ad eccezione di una paziente con mutazione di BRAF in cui si è diagnosticato un ipogonadismo ipogonadotropo e dunque all'età di 15,5 anni veniva avviata terapia per induzione della pubertà (Demestril Septem).

Valutando l'andamento di dosabilità persistente di ormone luteinizzante (LH) (Fig. 22), questo si verifica dai 9 anni nelle femmine e dai 10 anni nei maschi, a conferma di una fisiologica più tardiva attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonadi (I-I-G) nel in questi ultimi.

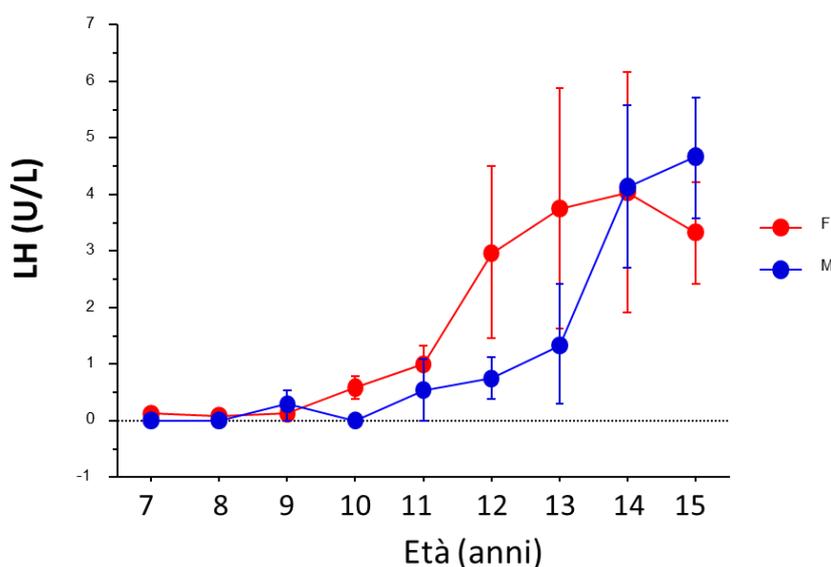


Figura 22: andamento dosabilità LH nel tempo: confronto sesso maschile-femminile

Parallelo differente andamento si riscontra nella dosabilità del testosterone per i maschi (n=3) e dell'estradiolo nelle femmine (n=5), (Fig. 23). In particolare, si registra una dosabilità persistente dell'estradiolo dai 9 anni e del testosterone da 11 anni, un anno dopo la dosabilità dell'LH.

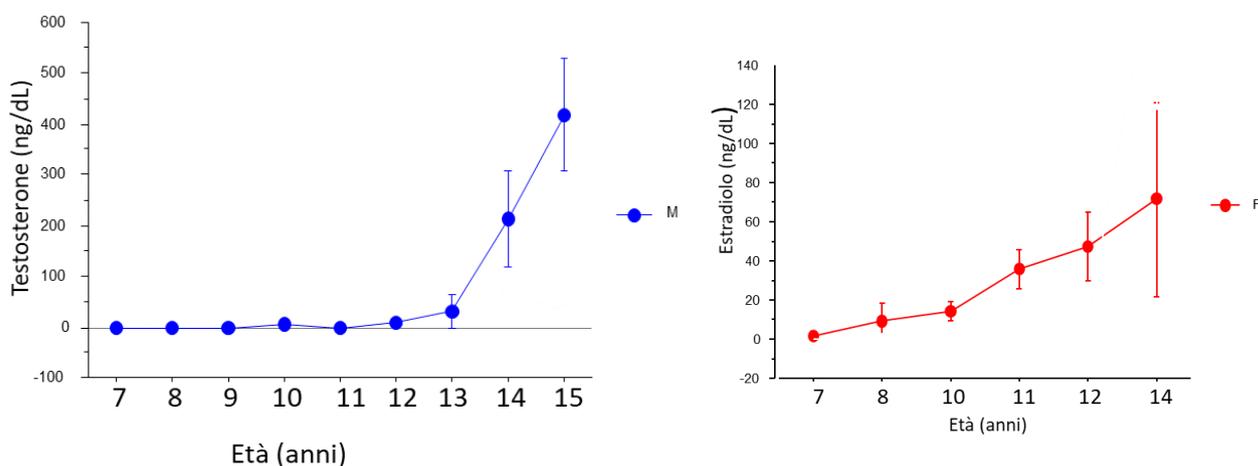


Figura 23: andamento dosabilità testosterone nei maschi ed estradiolo nelle femmine

6.5.1 Impatto dell'età all'attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonadi sull'andamento staturale nella coorte femminile.

Per quanto riguarda la coorte femminile che ha raggiunto l'avvio puberale (n=5), n=3 hanno avuto una dosabilità transitoria di LH (cioè $\geq 0,1$ U/L) precocemente, prima degli 8 anni. Queste 3 pazienti erano portatrici di mutazioni KRAS (n=2) e BRAF(n=1) e tutte erano in terapia con GH (durata mediana della terapia prima dell'avvio puberale: 4,3 anni (range:0,2-7,5 anni). Le altre due pazienti (portatrici di mutazioni BRAF, SOS1) hanno invece registrando una dosabilità di LH dopo gli 8 anni e anch'esse erano in terapia con GH (mediana anni di terapia prima della pubertà: 5,9 anni (range: 5,1-6,7 anni).

Delle 3 pazienti con attivazione più precoce dell'asse I-I-G, solo una è rimasta con un valore di LH persistentemente dosabile, suggerendo una pubertà precoce e per tale motivo è stata trattata con terapia bloccante utilizzando un analogo di GnRH.

Per valutare quale impatto questa più precoce attivazione dell'asse possa aver avuto sull'endpoint staturale è bene far riferimento alla Fig. 23. Con il limite dei numeri ridotti, al T0 cioè prima dell'inizio della terapia con GH, la mediana staturale era pari a -3,1 SDS (range: -4,0- -2,7SDS) per le 3 pazienti che avranno poi una più precoce attivazione dell'asse vs -2,2 SDS (range: -2,4- -2,0 SDS) per le altre 2 con più tardiva attivazione dell'asse, p=0,08. All'avvio puberale, n=3 avevano una mediana staturale pari a -2,2 SDS

(range: -4,4- -2,1 SDS) vs -2,4 SDS (range: -2,8- -1,9 SDS) delle altre due pazienti. Infine, all'ultimo controllo si registra una mediana pari a -3,2 SDS (range: -5,2- -3,0 SDS) in n=3 vs -1,1 SDS (range: -1,7- -0,4 SDS) in n=2, p=0,08.

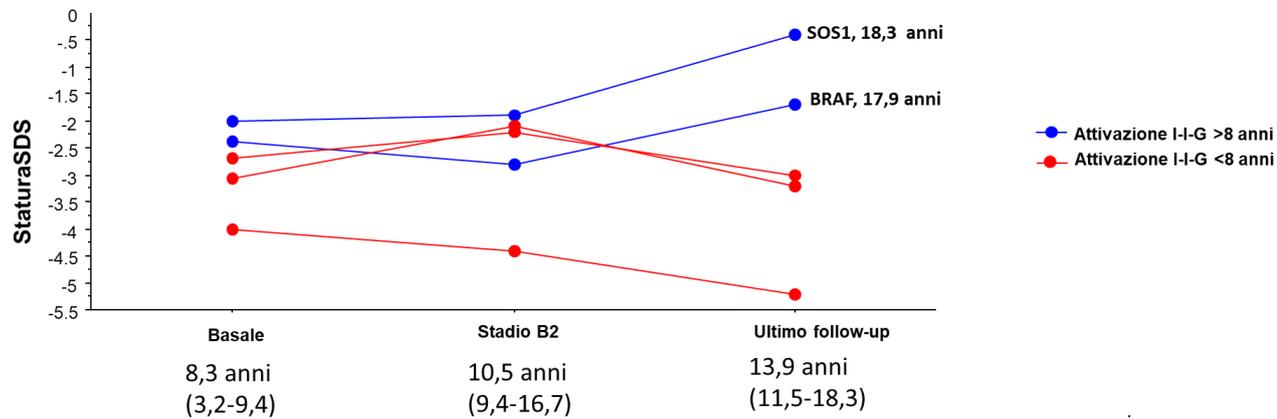


Figura 24: impatto attivazione asse I-I-G su endpoint staturale

Sulla base di ciò che è stato appena descritto, si evidenzia come le 3 pazienti con avvio puberale più precoce abbiano perso nel tempo 1 SDS, tornando ad avere una mediana staturale leggermente inferiore a quella registrata prima dell'inizio della terapia con GH. Le altre 2 pazienti invece hanno registrato un progressivo guadagno staturale nel tempo, arrivando all'ultimo controllo ad avere una mediana staturale nei limiti della norma.

Infine, costruendo un modello di regressione semplice (Tabella 19) è emerso che l'attivazione dell'asse I-I-G nella coorte femminile prima o dopo gli 8 anni predice in maniera quasi significativa (p=0,07) l'altezza all'ultimo controllo. In particolare, essa ha un valore di predittività pari a 61%.

	β stand.	P value	Adj.R ²
	F	F	F
Avvio puberale </>8 anni	-2.750	.0754	.606

Tabella 20: Analisi di regressione semplice: impatto età attivazione asse I-I-G su statura all'ultimo controllo

6.6 Andamento staturale nel tempo in base al sesso e allo stadio puberale.

Come evidenziato in Fig. 25, pur non essendoci nulla di statisticamente significativo, le femmine puberi ($n=5$) tendono ad avere una mediana staturale più bassa rispetto ai maschi puberi sia al baseline sia all'ultimo controllo. In particolare, esse tendono a mantenere una mediana staturale (inferiore a $-0,2$ SDS) minore di circa $0,7$ SDS rispetto a quella dei maschi.

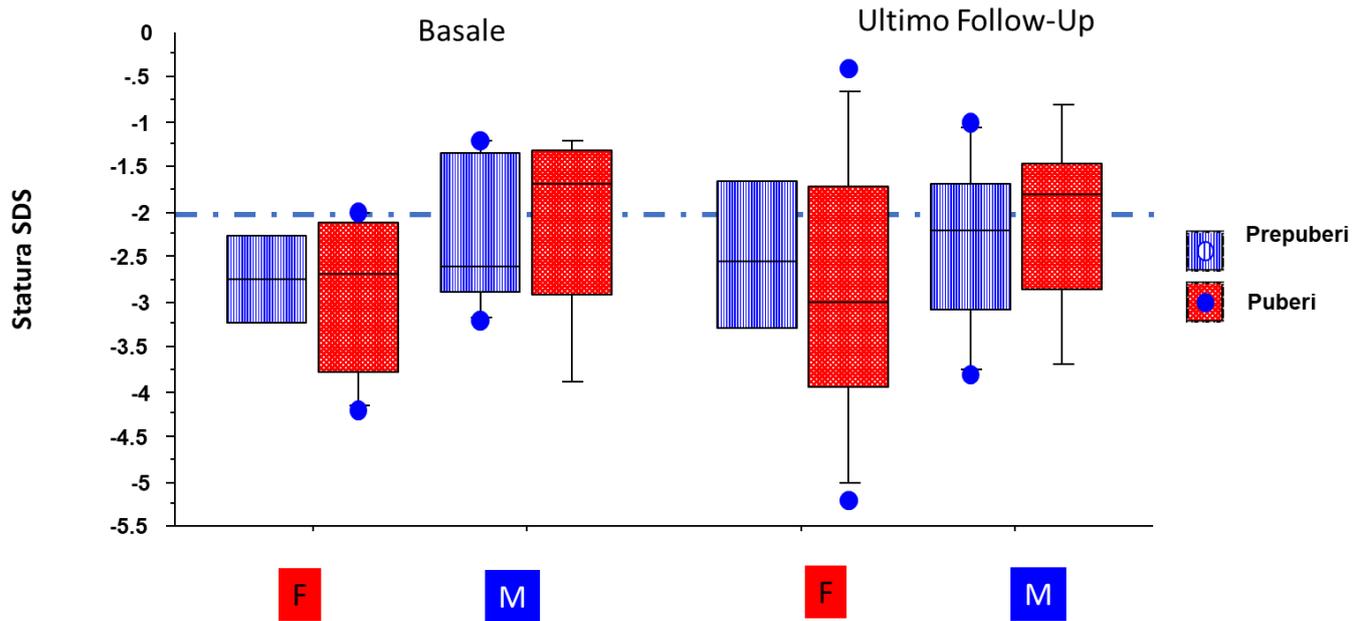


Figura 25: Andamento staturale nel tempo relativamente a sesso e stadio puberale

7. DISCUSSIONE

La sindrome di Noonan è una condizione patologica multisistemica ad ereditarietà per lo più dominante, a penetranza completa ed espressività variabile con una incidenza che varia da 1:1000 a 1:2500 nati vivi.

7.1 Mutazioni e relazione genotipo-fenotipo

Nel nostro studio retrospettivo sono stati arruolati 22 pazienti, 11 maschi e 11 femmine, con sindrome di Noonan geneticamente determinata.

All'interno della nostra coorte la mutazione più frequente è risultata essere PTPN11 (54,6%), in accordo con i dati presenti in letteratura. La seconda, invece, è stata BRAF (18,2%) seguita subito dopo da KRAS (13,6%), mutazioni che invece hanno una prevalenza nettamente inferiore in letteratura (rispettivamente 2% e 1%) (4). La mutazione a carico di SOS-1 (4,5%), registrata in letteratura come una delle più frequenti dopo PTPN11 (4,16), è rara nella nostra coorte.

RELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO:

Abbiamo riscontrata nel 100% dei casi la presenza di dismorfismi facciali, fondamentali per un iniziale orientamento diagnostico. In maniera più dettagliata abbiamo riscontrato: nei pazienti del nostro studio con mutazione a carico di PTPN11 si riconferma la stenosi della valvola polmonare come anomalia cardiaca congenita più frequente, in accordo con i dati della letteratura (4,11). Sempre in questi pazienti è stato registrato l'unico caso di deficit coagulativi a conferma del fatto che sono problemi relativamente più frequenti in questo gruppo (4,16). Per l'ambito neoplastico, non sono stati riscontrati casi di leucemia mielomonocitica giovanile, bensì due casi di neoplasie solide (DNET), a differenza di ciò che viene dichiarato in letteratura riguardo a questa mutazione (26,27).

In merito al fenotipo associato a mutazione di BRAF, in questi pazienti non dovrebbe esserci una alta frequenza di deficit cardiaci congeniti (4,48), che invece sono stati riscontrati in 3 casi su 4: un caso di stenosi e/o displasia della valvola polmonare, un caso di difetto settale inter-atriale e un ultimo con anomalia a carico della valvola mitrale. Al contrario dei dati segnalati in letteratura nella nostra coorte ben 3 casi su 4 avevano GHD. Si conferma, invece, la maggiore incidenza di deficit neuro-sensoriali e di ritardo psico-motorio (4,24).

Nei bambini affetti da mutazione del gene KRAS si riconferma un'alta prevalenza di ritardo psicomotorio, in accordo con i dati della letteratura (24,25).

In merito all'unico paziente diagnosticato con mutazione di SOS1, questo presenta stenosi della valvola polmonare cardiaca e difetti settali (in accordo con la letteratura) e ha presentato deficit di GH per cui

è stato trattato con rhGH mantenendo nel tempo una statura all'interno del range di normalità. Riguardo a quest'ultima caratteristica, in letteratura è descritta una minor prevalenza di bassa statura associata a tale mutazione, tuttavia la casistica presentata in letteratura è troppo ristretta per trarre delle conclusioni sull'endpoint staturale di questi pazienti. (4,43)

Relativamente all'unico caso con mutazione del gene SHOC-2, in accordo con la letteratura, presenta deficit di GH. Non ha però evidenza di deficit cardiaci congeniti mentre in letteratura viene indicata una maggiore prevalenza di difetti settali. Infine, il paziente con mutazione a carico di RIT-1 presenta stenosi della valvola polmonare (in accordo con la letteratura) ma non cardiomiopatia ipertrofica. Inoltre, non presenta deficit di GH e ha dimostrato una statura nel range di normalità SDS al primo e ultimo controllo, in accordo sempre con la letteratura. (4,50,52)

Dall'aprile 2021 è stata estesa l'indicazione al trattamento con ormone della crescita a tutti i soggetti con SN (revisione NOTA AIFA 039), che fino ad oggi erano trattati solo se deficitari o con richiesta approvata dalla commissione del farmaco. La bassa statura è il fenotipo più frequente dopo le dismorfie facciali e l'impatto sulla qualità di vita è rilevante. In letteratura emerge che il trattamento con GH migliora la statura definitiva dei soggetti trattati, ma le casistiche riportate hanno per lo più una diagnosi di SN clinica e non molecolare e scarsi sono i dati a confronto tra soggetti trattati e non trattati con outcomes variabili e un guadagno medio di circa 0.7 SDS. Per tali ragioni abbiamo voluto studiare l'impatto della terapia con GH nella nostra casistica includendo esclusivamente soggetti con diagnosi genetica; la non determinazione dell'impatto del GH in base alla genetica, potrebbe infatti giustificare i dati discordanti in letteratura. Dall'altro lato è riportato un ritardo puberale, soprattutto in soggetti con la mutazione più frequente PTPN11, ma ancora più scarsi sono i dati confermantici tale tendenza. In parallelo abbiamo quindi voluto studiare l'impatto della pubertà e del momento dell'attivazione biochimica della pubertà sull'outcome staturale.

7.2 Andamento antropometrico nel tempo

Pazienti GHD e non GHD.

Al baseline il 77,3% (17/22) dei pazienti presentava una statura patologica, al di sotto di -2,0 SDS, in accordo con quanto dichiarato in letteratura, con una prevalenza di ipostaturalità stimata intorno a 50-70%. Tutti i soggetti con ipostaturalità sono stati testati per la secrezione di GH e 10 su 22 (45,5%) sono risultati deficitari con una mediana staturale ed età al baseline inferiori rispetto ai non GHD: -3,0 SDS ad un'età mediana di 2,9 anni vs -2,2 SDS ad un'età mediana di 4,7 anni. Solo 5 soggetti della nostra

corte raggiunge statura definitiva per cui abbiamo utilizzato la statura raggiunta all'ultimo controllo dai 22 soggetti per definire possibili predittori.

Nella nostra corte non si sono rilevate differenze significative nella statura durante il follow up tra femmine e maschi anche se femmine puberi mantengono un valore staturale di circa 0,7 SDS più basso rispetto ai maschi puberi. Come dettagliato più specificatamente nel capitolo puberale, i nostri dati preliminari sembrano indicare che la precoce attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi documentato in più del 50% delle femmine valutabili per tale aspetto, possa giustificare l'impatto negativo sull'endpoint staturale.

Non rilevando differenze staturali tra maschi e femmine, e per la scarsa numerosità della corte, abbiamo valutato l'impatto del GH sulla statura nella corte in toto. Similmente ai dati di letteratura abbiamo riscontrato un guadagno di statura di circa 0.6 SDS nei soggetti trattati con GH rispetto ai non trattati, anche se tale gruppo è rimasto più basso dei soggetti non trattati all'ultimo follow-up, considerato surrogato preliminare della risposta al GH in quanto solo 5 dei nostri soggetti hanno raggiunto una statura definitiva. Testando l'ipotesi di un differente impatto molecolare sulla risposta al GH, non abbiamo rilevato un differente pattern tra soggetti PTPN11 rispetto ai non PTPN11. Tuttavia, tale aspetto andrà confermato al raggiungimento della statura definitiva. In accordo con la letteratura, alla nascita i parametri auxologici (peso SDS, lunghezza SDS, circonferenza cranica SDS) risultano tutti nella norma, a conferma di una perdita di potenziale accrescitivo post natale nelle SN.

Alcuni soggetti trattati con GH hanno interrotto il trattamento per eventi avversi non correlabili al GH, per cui abbiamo considerato all'ultimo controllo i pazienti GHD rimasti sempre in terapia con GH (n=8) per una mediana di 6,7 anni (range 1,4-10,9) ad una dose mediana costante di 0,029 mg/kg/die. Contrariamente alle dosi utilizzate in letteratura, abbiamo utilizzato dosi inferiori in base alla titolazione delle IGF-1 che è rimasta normale, e sempre significativamente maggiore rispetto ai non trattati (-1,5 SDS), a conferma di un'adeguata compliance al trattamento. Nonostante questa scelta, condotta per safety poiché è noto che alcune mutazioni, in particolare PTPN11 possono associarsi a tumori, il guadagno rilevato è sovrapponibile a ciò che è stato riscontrato nelle corte trattate a dosi decisamente maggiori.

Dato che è noto che il GH agisce anche sulla composizione corporea, con azione lipolitica e trofica sulla massa magra, abbiamo studiato anche l'impatto sul BMI che tuttavia è rimasto nella norma per tutto il follow-up indipendentemente dal trattamento con GH. Una limitazione dello studio è rappresentata dalla mancanza di informazioni DEXA di questi pazienti: non è stato dunque possibile valutare le variazioni di massa magra-grassa indotte dalla terapia con GH e di conseguenza non è stato possibile interpretare adeguatamente i riscontri sul BMI SDS.

Infine, mediante analisi di regressione multivariata è emerso come solo l'altezza al baseline predica in maniera significativa l'altezza all'ultimo controllo nei pazienti non GHD dopo correzione per target genetico e sesso. Dose e durata del trattamento con GH e IGF-1 non sono invece risultati influenzanti la statura nei soggetti trattati.

7.3 Andamento antropometrico nel tempo: confronto tra pazienti PTPN11 e non PTPN11.

I pazienti con mutazione di PTPN11 hanno alla prima visita un valore mediano di altezza SDS sovrapponibile ai pazienti con altre mutazioni -2,6 SDS (range: -3,5- -1,2 SDS) vs -2,5 SDS (range: -4,2- -1,3). Solo 3 pazienti PTPN11 hanno fatto terapia con GH, contrariamente al 75% dei pazienti non PTPN11. Durante il follow-up pazienti con mutazione di PTPN11 tendano ad avere sempre una mediana staturale inferiore ed un minore guadagno staturale totale (0,1 SDS (range: -1,4-0,9 SDS) vs 0,3 SDS (range: -0,3-1,6 SDS)) rispetto ai non PTPN11, in accordo con quanto affermato in letteratura dato che la mutazione PTPN11 si associa ad una moderata resistenza all'azione del GH (3,32). Questo dato però, deve essere interpretato tenendo conto anche del minor numero di pazienti in terapia con GH rispetto a quelli con mutazioni differenti dal PTPN11. Analogo andamento è evidenziato per i valori di IGF-1 dove si registra una mediana di valore di IGF-1 nei PTPN11 inferiore già alla prima visita (-2,0 SDS vs -1,2 SDS per i non PTPN11) che si mantiene inferiore fino all'ultimo controllo (-1,5 SDS (range: -3,8-0,5 SDS) vs -0,1 SDS (-3,1-2,8 SDS)). Questa differenza di andamento dei valori di IGF-1 tra i due gruppi, è giustificata anche dal fatto che all'interno dei pazienti non PTPN11 vi sono più pazienti in terapia con GH (7/10) rispetto ai PTPN11 (3/12). Inoltre, è anche in accordo con i dati della letteratura che evidenziano una minore concentrazione di IGF-1 per la moderata resistenza all'azione del GH nei PTPN11.

Differente invece è l'andamento del BMI in questi due gruppi: mentre i pazienti non PTPN11 tendono ad avere una perdita di 0,4 SDS del valore mediano di BMI tra il primo e l'ultimo controllo (-0,3 SDS al T0, -0,7 SDS al T5) i pazienti PTPN11 tendono invece ad avere un guadagno nel tempo (-0,4 SDS al T0, -0,1 SDS al T5). Questi dati sono sempre da interpretare tenendo in considerazione la mancanza di informazioni DEXA, per cui non possiamo interpretare effettivamente le variazioni di massa magra-grassa in questi pazienti date anche dall'utilizzo del GH. Alla luce di quanto appena descritto, i pazienti non PTPN11 tendono ad avere un guadagno totale di BMI SDS espresso in mediana inferiore rispetto ai PTPN11: -0,5 SDS vs 0,1 SDS, $p=0,06$.

7.4 Attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonadi e impatto dell'età all'attivazione dell'asse sull'andamento staturale nella coorte femminile.

L'avvio puberale dal punto di vista clinico (stadio B2/G2) è stato raggiunto in 8 pazienti su 22, n=3 maschi portatori di mutazioni SHOC-2, PTPN11, KRAS) di cui n=1 in terapia con GH da circa 5 anni e n=5 femmine (portatrici di mutazioni: KRAS (n=2), BRAF (n=2), SOS1 (n=1)), tutte in terapia con GH per una durata mediana pari a 5,1 anni (range:0,2-7,5 anni).

L'avvio puberale clinico è insorto ad una età mediana totale pari a 12,2 anni (range: 9,4-16,5 anni), più precocemente nelle femmine rispetto ai maschi: 10,5 anni (range:9,4-16,6 anni) vs 12,7 anni (range: 11,7-13,7 anni). Esso, dunque, avviene all'interno del range di normalità di età per le femmine (8-13 anni) e per i maschi (9-14 anni), confermando un avvio più tardivo nei maschi. I nostri dati però, documentano un avvio puberale più precoce rispetto alla letteratura sia per i maschi (12,7 vs 13,4 anni) sia per le femmine (10,5 vs 13 anni) (30). Altra considerazione importante è relativa al fatto che la pubertà inizia spontaneamente in questi pazienti e ciò sta ad indicare la presenza di un normale input ipotalamo-ipofisario. Solo in una paziente con mutazione di BRAF si è diagnosticato un ipogonadismo ipogonadotropo e dunque all'età di 15,5 anni veniva avviata terapia per induzione della pubertà (Demestril septem).

Relativamente all'avvio puberale nella coorte femminile, un elemento particolare è stato il rilevamento di una dosabilità dell'ormone LH prima degli 8 anni in 3 pazienti su 5. Queste 3 pazienti erano portatrici di mutazioni KRAS (n=2) e BRAF(n=1) e tutte erano in terapia con GH (durata mediana della terapia prima dell'avvio puberale: 4,3 anni (range:0,2-7,5 anni). Le altre due pazienti (portatrici di mutazioni BRAF, SOS1) hanno invece registrando una dosabilità di LH dopo gli 8 anni e anch'esse erano in terapia con GH (mediana anni di terapia prima della pubertà: 5,9 anni (range: 5,1-6,7 anni). Di queste 3 pazienti solamente una è stata diagnosticata con pubertà precoce per cui è stata avviata terapia bloccante con analoghi di GnRH. Le altre 2 pazienti possono essere considerate quindi avviate anticipatamente dal punto di vista biochimico. Tale attivazione biochimica dell'asse I-I-G prima degli 8 anni sembra però aver avuto un impatto negativo sull'endpoint staturale di queste pazienti che in realtà partivano già alla prima visita da una mediana staturale inferiore rispetto alle altre 2 pazienti: a -3,1 SDS (range: -4,0- -2,7SDS) vs -2,2 SDS (range: -2,4- -2,0 SDS). Questo andamento si riconferma all'avvio puberale dove però si riduce la differenza mediana tra i due gruppi, suggerendo un transitorio effetto positivo degli estrogeni, tuttavia non mantenuto poiché all'ultima visita si rileva una mediana staturale decisamente inferiore e patologica -3,2 SDS (range: -5,2- -3,0 SDS) vs -1,1 SDS (range: -1,7- -0,4 SDS). Ciò, dunque, suggerisce come le 3 pazienti con avvio puberale più precoce abbiano perso nel

tempo 1 SDS, tornando ad avere una mediana staturale addirittura inferiore a quella registrata prima dell'inizio della terapia con GH. Le altre 2 pazienti invece hanno registrato un progressivo guadagno staturale nel tempo, arrivando all'ultimo controllo ad avere una mediana staturale nei limiti della norma. Questo è stato confermato anche dall'analisi di regressione semplice dove è emerso che quanto prima si attiva l'asse I-I-G quanto più la statura all'ultima visita è ridotta, $p=0,07$.

8. CONCLUSIONI

Dal nostro studio abbiamo dunque rilevato come l'ipostaturalità sia una condizione patologica estremamente frequente nei pazienti affetti da sindrome di Noonan (77,3%), senza differenze di genere e senza apparente impatto in base alla mutazione genetica riscontrata. Nonostante la terapia con GH effettuata con un'adeguata compliance al trattamento i pazienti con sindrome di Noonan e GHD tendono a mantenere una statura patologica ($< -2,0$ SDS) rispetto ai non GHD. Contrariamente a ciò che è riportato in letteratura, non abbiamo rilevato una tendenza al ritardo puberale, bensì al contrario un'attivazione anticipata nelle femmine ($>50\%$ dei soggetti valutabili), suggerendo un possibile dimorfismo di genere che andrà approfondito su casistiche maggiori.

In sintesi, probabilmente dosi maggiori di GH ed un eventuale blocco transitorio dell'avvio puberale nelle femmine potrebbero migliorare l'outcome staturale in alcuni soggetti con sindrome di Noonan.

Possibili prospettive future risultano essere:

- Valutare l'impatto del GH indipendentemente dal difetto molecolare e dal difetto di GH (in relazione alle NOTA AIFA 039, determina del 04.2021);
- Valutare il potenziale di utilizzo di analoghi GnRH nelle pazienti femmine con rilievo biochimico di aumento dell'LH corrispondente ad un'attivazione dell'asse I-I-G prima degli 8 anni:
 - Esecuzione LHRH test/eco pelvi
 - Monitoraggio di LH/Estradiolo a partire dai 5 anni di età

9. BIBLIOGRAFIA

1. Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome. *The Lancet*. gennaio 2013;381(9863):333–42.
2. Mendez HMM, Opitz JM, Reynolds JF. Noonan syndrome: A review. *Am J Med Genet*. luglio 1985;21(3):493–506.
3. Jorge AAL, Malaquias AC, Arnhold IJP, Mendonca BB. Noonan Syndrome and Related Disorders: A Review of Clinical Features and Mutations in Genes of the RAS/MAPK Pathway. *Horm Res Paediatr*. 2009;71(4):185–93.
4. Stevenson DA. Noonan Syndrome. *BMJ Best Practise*; 2018.
5. Lutz J-C, Nicot R, Schlund M, Schaefer E, Bornert F, Fioretti F, et al. Dental and maxillofacial features of Noonan Syndrome: Case series of ten patients. *J Cranio-Maxillofac Surg*. marzo 2020;48(3):242–50.
6. van der Burgt I. Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. dicembre 2007;2(1):4.
7. Allanson JE, Bohring A, Dörr H-G, Dufke A, Gillissen-Kaesbach G, Horn D, et al. The face of Noonan syndrome: Does phenotype predict genotype. *Am J Med Genet A*. agosto 2010;152A(8):1960–6.
8. Turner AM. Noonan syndrome. *J Paediatr Child Health*. 2014;50(10):E14–20.
9. Reinker KA, Stevenson DA, Tsung A. Orthopaedic Conditions in Ras/MAPK Related Disorders. *J Pediatr Orthop*. luglio 2011;31(5):599–605.
10. Stevenson DA, Allen S, Tidyman WE, Carey JC, Viskochil DH, Stevens A, et al. Peripheral muscle weakness in RASopathies. *Muscle Nerve*. 2012;46(3):394–9.
11. Linglart L, Gelb BD. Congenital heart defects in Noonan syndrome: Diagnosis, management, and treatment. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2020;184(1):73–80.
12. Scott A, Di Giosaffatte N, Pinna V, Daniele P, Corno S, D'Ambrosio V, et al. When to test fetuses for RASopathies? Proposition from a systematic analysis of 352 multicenter cases and a postnatal cohort. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 10 febbraio 2021;
13. Draaisma JMT, Drossaers J, van den Engel-Hoek L, Leenders E, Geelen J. Young children with Noonan syndrome: evaluation of feeding problems. *Eur J Pediatr*. 2020;179(11):1683–8.
14. Moniez S, Pienkowski C, Lepage B, Hamdi S, Daudin M, Oliver I, et al. Noonan syndrome males display Sertoli cell-specific primary testicular insufficiency. *Eur J Endocrinol*. dicembre 2018;179(6):409–18.
15. Biko DM, Reisen B, Otero HJ, Ravishankar C, Victoria T, Glatz AC, et al. Imaging of central lymphatic abnormalities in Noonan syndrome. *Pediatr Radiol*. 1 maggio 2019;49(5):586–92.
16. Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, et al. Noonan Syndrome: Clinical Features, Diagnosis, and Management Guidelines. *PEDIATRICS*. 1 ottobre 2010;126(4):746–59.
17. Bellio M, Garcia C, Edouard T, Voisin S, Neel BG, Cabou C, et al. Catalytic dysregulation of SHP2 leading to Noonan syndromes affects platelet signaling and functions. *Blood*. 19 dicembre 2019;134(25):2304–17.

18. Nugent DJ, Romano AA, Sabharwal S, Cooper DL. Evaluation of bleeding disorders in patients with Noonan syndrome: a systematic review. *J Blood Med.* 23 ottobre 2018;9:185–92.
19. Artoni A, Selicorni A, Passamonti SM, Lecchi A, Bucciarelli P, Cerutti M, et al. Hemostatic abnormalities in Noonan syndrome. *Pediatrics.* maggio 2014;133(5):e1299-1304.
20. Quaio CRDC, Carvalho JF, da Silva CA, Bueno C, Brasil AS, Pereira AC, et al. Autoimmune disease and multiple autoantibodies in 42 patients with RASopathies. *Am J Med Genet A.* maggio 2012;158A(5):1077–82.
21. Lee NB, Kelly L, Sharland M. OCULAR MANIFESTATIONS OF NOONAN SYNDROME. :7.
22. van Trier DC, Vos AMC, Draaijer RW, van der Burgt I, Draaisma JMTh, Cruysberg JRM. Ocular Manifestations of Noonan Syndrome. *Ophthalmology.* ottobre 2016;123(10):2137–46.
23. Verhoeven W, Wingbermühle E, Egger J, Burgt IV der, Tuinier S. Noonan syndrome: Psychological and psychiatric aspects. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(2):191–6.
24. Pierpont EI, Tworog-Dube E, Roberts AE. Learning and memory in children with Noonan syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013;161(9):2250–7.
25. Lazzaro G, Caciolo C, Menghini D, Cumbo F, Digilio MC, Capolino R, et al. Defining language disorders in children and adolescents with Noonan Syndrome. *Mol Genet Genomic Med.* aprile 2020;8(4):e1069.
26. Villani A, Greer M-LC, Kalish JM, Nakagawara A, Nathanson KL, Pajtler KW, et al. Recommendations for Cancer Surveillance in Individuals with RASopathies and Other Rare Genetic Conditions with Increased Cancer Risk. *Clin Cancer Res.* 15 giugno 2017;23(12):e83–90.
27. Jongmans MCJ, van der Burgt I, Hoogerbrugge PM, Noordam K, Yntema HG, Nillesen WM, et al. Cancer risk in patients with Noonan syndrome carrying a PTPN11 mutation. *Eur J Hum Genet.* agosto 2011;19(8):870–4.
28. Denayer E, Devriendt K, de Ravel T, Van Buggenhout G, Smeets E, Francois I, et al. Tumor spectrum in children with Noonan syndrome and SOS1 or RAF1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer.* marzo 2010;49(3):242–52.
29. Ranke MB, Heidemann P, Knupfer C, Enders H, Schmaltz AA, Bierich JR. Noonan syndrome: growth and clinical manifestations in 144 cases. *Eur J Pediatr.* dicembre 1988;148(3):220–7.
30. Romano AA, Dana K, Bakker B, Davis DA, Hunold JJ, Jacobs J, et al. Growth Response, Near-Adult Height, and Patterns of Growth and Puberty in Patients with Noonan Syndrome Treated with Growth Hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 luglio 2009;94(7):2338–44.
31. Binder G, Neuer K, Ranke MB, Wittekindt NE. PTPN11 Mutations Are Associated with Mild Growth Hormone Resistance in Individuals with Noonan Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 settembre 2005;90(9):5377–81.
32. Binder G. Noonan Syndrome, the Ras–MAPK Signalling Pathway and Short Stature. *Horm Res Paediatr.* 2009;71(Suppl. 2):64–70.
33. Şıklar Z, Genens M, Poyrazoğlu Ş, Baş F, Darendeliler F, Bundak R, et al. The Growth Characteristics of Patients with Noonan Syndrome: Results of Three Years of Growth Hormone Treatment: A Nationwide Multicenter Study. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 1 settembre 2016;8(3):305–12.

34. Osio D, Dahlgren J, Wikland KA, Westphal O. Improved final height with long-term growth hormone treatment in Noonan syndrome. *Acta Paediatr.* 2005;94(9):1232–7.
35. Noordam C, Peer PGM, Francois I, De Schepper J, van den Burgt I, Otten BJ. 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.* settembre 2008;159(3):203–8.
36. Ferreira LV, Souza SAL, Arnhold IJP, Mendonca BB, Jorge AAL. PTPN11 (Protein Tyrosine Phosphatase, Nonreceptor Type 11) Mutations and Response to Growth Hormone Therapy in Children with Noonan Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 settembre 2005;90(9):5156–60.
37. Seo GH, Yoo H-W. Growth hormone therapy in patients with Noonan syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* dicembre 2018;23(4):176–81.
38. Noonan JA, Kappelgaard A-M. The Efficacy and Safety of Growth Hormone Therapy in Children with Noonan Syndrome: A Review of the Evidence. *Horm Res Paediatr.* 2015;83(3):157–66.
39. Takagi M, Miyashita Y, Koga M, Ebara S, Arita N, Kasayama S. Estrogen deficiency is a potential cause for osteopenia in adult male patients with Noonan’s syndrome. *Calcif Tissue Int.* marzo 2000;66(3):200–3.
40. Guo Y-J, Pan W-W, Liu S-B, Shen Z-F, Xu Y, Hu L-L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med.* marzo 2020;19(3):1997–2007.
41. Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet.* giugno 2003;34(2):148–50.
42. El Bouchikhi I, Belhassan K, Moufid FZ, Iraqui Houssaini M, Bouguenouch L, Samri I, et al. Noonan syndrome-causing genes: Molecular update and an assessment of the mutation rate. *Int J Pediatr Adolesc Med.* 1 dicembre 2016;3(4):133–42.
43. Lepri F, De Luca A, Stella L, Rossi C, Baldassarre G, Pantaleoni F, et al. SOS1 Mutations in Noonan Syndrome: Molecular Spectrum, Structural Insights on Pathogenic Effects, and Genotype–Phenotype Correlations. *Hum Mutat.* luglio 2011;32(7):760–72.
44. Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* agosto 2007;39(8):1013–7.
45. Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* agosto 2007;39(8):1007–12.
46. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Böll S, Klein C, Bollag G, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* marzo 2006;38(3):331–6.
47. Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C, Horn D, et al. A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet.* gennaio 2010;42(1):27–9.
48. Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, et al. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: Molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat.* 2009;30(4):695–702.

49. Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, et al. Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype–phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet.* 1 dicembre 2007;44(12):763–71.
50. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma’ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation in SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and underlies Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet.* settembre 2009;41(9):1022–6.
51. Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet.* 13 agosto 2010;87(2):250–7.
52. Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, et al. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *Am J Hum Genet.* 11 luglio 2013;93(1):173–80.
53. Chen P-C, Yin J, Yu H-W, Yuan T, Fernandez M, Yung CK, et al. Next-generation sequencing identifies rare variants associated with Noonan syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 agosto 2014;111(31):11473–8.
54. Gripp KW, Aldinger KA, Bennett JT, Baker L, Tusi J, Powell-Hamilton N, et al. A novel rasopathy caused by recurrent de novo missense mutations in PPP1CB closely resembles Noonan syndrome with loose anagen hair. *Am J Med Genet A.* settembre 2016;170(9):2237–47.
55. A Clinical Guideline: Noonan Syndrome Guideline Development Group. In: Noonan Syndrome [Internet]. Elsevier; 2019 [citato 24 aprile 2021]. pag. 159–88. Disponibile su: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128153482099874>