



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Scuola di Dottorato di Ricerca in Medicina e Chirurgia

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche

XXX ciclo

Genetica delle aortopatie toraciche

Tutor

Prof. Armando Gabrielli

Dottorando

Dr.ssa Giada Tortora

Introduzione	3
<i>Elementi patofisiologici negli aneurismi aortici toracici</i>	4
<i>Basi genetiche di TAA</i>	6
a) <i>Forme sindromiche</i>	6
b) <i>Forme non sindromiche</i>	8
<i>Pathways patogenetici</i>	11
a) <i>Struttura della matrice extracellulare</i>	11
b) <i>TGFβ signalling</i>	12
c) <i>Apparato contrattile delle cellule vascolari muscolari lisce</i>	14
Aortopatia e valvola aortica bicuspid	15
<i>Razionale ed obiettivo dello studio</i>	15
<i>Materiali e metodi</i>	16
a) <i>Soggetti arruolati</i>	16
b) <i>Analisi mutazionale di ACTA2</i>	17
c) <i>Analisi NGS dei geni correlati a BAV tramite targeted panel</i>	17
d) <i>Analisi dell'esoma</i>	18
e) <i>Analisi statistica</i>	19
<i>Risultati</i>	19
a) <i>Analisi di sequenziamento di ACTA2 ed analisi NGS dei geni correlati a BAV</i> 19	19
b) <i>Analisi dell'esoma</i>	19
c) <i>Dati clinici</i>	20
<i>Discussione</i>	27
Sindrome di Loeys-Dietz	32
<i>Nuovi tipi di LDS: LDS tipo 3 e LDS tipo 4</i>	35
<i>Diagnosi di LDS, diagnosi differenziale e gestione clinica</i>	36
<i>Nuovi geni: TGFBR3 e SMAD2</i>	40
<i>Razionale e scopo dello studio</i>	41
<i>Materiali e Metodi</i>	42
a) <i>Creazione del database</i>	42
b) <i>Raccolta della casistica della letteratura</i>	42
c) <i>Raccolta della casistica dei tre centri Internazionali</i>	43
<i>Risultati</i>	44
<i>Discussione</i>	59
Bibliografia	64

Introduzione

Gli aneurismi aortici costituiscono il risultato di una progressiva dilatazione dell'aorta causata da una debolezza della parete vascolare. Questa condizione rimane generalmente misconosciuta fino al riscontro incidentale nel corso di indagini di imaging o fino all'evento acuto di dissezione o rottura. Questi ultimi eventi sono associati ad una mortalità di circa 80% (Criado, 2011). Inoltre, si stima che gli aneurismi e le dissezioni aortiche rappresentino circa l'1-2% di tutti i decessi nei Paesi occidentali (Lindsay et al., 2011). L'incidenza potrebbe in realtà essere sottostimata poiché una dissezione aortica acuta può essere confusa con un attacco cardiaco (Elefteriades, 2008).

Gli aneurismi aortici sono suddivisi in due gruppi principali in base alla posizione anatomica: aneurismi aortici addominali (AAA, al di sotto del diaframma) e aneurismi aortici toracici (TAA, al di sopra del diaframma). Gli AAA sono più comuni dei TAA, con una prevalenza rispettivamente di circa 5% e 1% (Li et al., 2013).

L'eziologia degli AAA è tuttora poco chiarita, ma sembra essere multifattoriale e fortemente eterogenea. I fattori di rischio sono: l'età avanzata (maggiore di 65 anni), il sesso maschile (rapporto maschi femmine 6:1), l'origine Europea (Kuivaniemi et al., 2014); altri fattori di rischio, modificabili, sono il fumo, l'iperlipidemia, e l'ipertensione (Sakalihasan et al., 2014; Van Vlijmen-Van Keulen et al., 2005). Infine, una storia familiare positiva è associata ad un alto rischio (12% dei pazienti con AAA), sottolineando il coinvolgimento di determinanti genetiche nell'eziologia degli AAA (Sakalihasan et al., 2014). Ad oggi, alcuni loci cromosomici (19q13.3 e 4q31) sono stati associati agli AAA familiari, tuttavia le varianti causative sottostanti non sono ancora state identificate (Van Vlijmen-Van Keulen et al., 2005; Shibamura et al., 2004). I geni di rischio per gli AAA, identificati tramite studi di associazione, sono *AGTRI*, *CDKN2BAS*, *DAB2IP*, *IL6R*, *LDLR*, *LPA*, *LRP1*, *MMP3*, e *SORT1* (Bradley et al., 2016).

In confronto agli AAA, i TAA presentano una minore frequenza, ma sono stati studiati in maniera molto più approfondita nelle ultime due decadi poiché colpiscono individui più giovani, compresi i bambini, e hanno una ereditabilità più alta. Approssimativamente il 20-25% dei pazienti con TAA ha una familiarità

positiva, di cui circa un quarto presenta una aortopatia ascrivibile ad una patologia del tessuto connettivo mendeliana. Ad oggi, gli studi di ricerca hanno identificato circa 20 geni con un ruolo causale nei TAA (Andelglinger et al., 2016). Sebbene questi geni spieghino circa meno del 30% di tutti i casi familiari dei TAA (Pyeritz, 2014), la loro identificazione e caratterizzazione funzionale è stata cruciale per le acquisizioni attuali sulla patogenesi dei TAA, e per fornire un modello per lo studio di condizioni aneurismatiche ereditarie.

Elementi patofisiologici negli aneurismi aortici toracici

Il principale substrato patologico dei TAA è rappresentato dalla degenerazione mediale dell'aorta. Questa occorre fisiologicamente durante l'invecchiamento, mentre nei TAA può essere esacerbata da una predisposizione genetica e dall'ipertensione (LeMaire et al., 2011). Dal punto di vista istologico, la degenerazione mediale è caratterizzata da deplezione di cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) (Bonderman et al., 1999), frammentazione e perdita di fibre elastiche ed eccessiva produzione e disorganizzazione del collagene (Dobrin et al., 1994). I prodotti degradati dei proteoglicani e dei glicosaminoglicani tipicamente si accumulano nelle aree con deplezione cellulare (Martufi et al., 2014). Collettivamente, questi eventi indeboliscono la parete aortica, aumentando quindi la probabilità di patologia aneurismatica.

Per quanto riguarda le tipologie di cellule coinvolte nel processo patologico che conduce alla formazione di aneurisma aortico, gli studi condotti finora, utilizzando campioni interi di parete aortica, non sono riusciti a delineare il ruolo dei differenti tipi cellulari derivanti dalla parete aortica. Sicuramente nell'ultima decade un ruolo di rilievo è stato riconosciuto alle VSMC: in condizioni fisiologiche le VSMC governano le proprietà meccaniche della parete aortica regolando la formazione e l'integrità della matrice extracellulare (ECM) (Sazonova et al., 2015). L'ECM rappresenta una zona di molecole circondate da cellule che provvedono all'elasticità e alla forza tensiva del tessuto e che possono sequestrare fattori di crescita. Le VSMC secernono endopeptidasi e loro inibitori, come metalloproteinasi della matrice (MMP) e inibitori tissutali di MMP (TIMP), in maniera strettamente controllata in modo da regolare il turnover ECM (Newby, 2006). Nei pazienti con TAA, l'espressione sbilanciata di MMP e TIMP favorisce una eccessiva secrezione di MMP, in particolare MMP2 e MMP9, che conduce ad

una alterata degradazione di ECM (Zhang et al., 2009). Come risultato la parete aortica entra in una fase proteolitica che favorisce la riduzione del contenuto di elastina e il cross-linking delle fibre elastiche che si presenta istologicamente con frammentazione di fibre di elastina (Chung et al., 2007). I MMP colpiscono anche il collagene aortico, come dimostrato dalla deposizione disorganizzata di fibre collagene in campioni di tessuto da pazienti con TAA (Chung et al., 2007). A causa della disorganizzazione della ECM dovuta ai MMP, i fattori di crescita che sono normalmente sequestrati nella matrice, come il transforming growth factor- β (TGF β) e il connective tissue growth factor (CTGF), vengono rilasciati, stimolando così la produzione di collagene (Chung et al., 2007; Chung et al., 2008). Ad ogni modo, alcuni studi suggeriscono che un cambio nelle tipologie di collagene (dal tipo I e III al tipo V e XI) alteri la struttura della parete aortica (Rabkin, 2015) in maniera indipendente dalla degradazione di ECM MMP-dipendente, modificando così il contenuto totale del collagene. Ulteriori esperimenti sono necessari per far luce sulle specifiche molecole coinvolte nello squilibrio patologico dell'espressione del collagene.

Le VSMC sono coinvolte nella degenerazione mediale dell'aorta anche attraverso altri meccanismi, tuttavia meno caratterizzati. Ad esempio, può verificarsi un'eccessiva apoptosi di VSMC come risultato di una aumentata espressione dei recettori II dell'angiotensina di tipo 2 (Nagashima et al., 2001). Le VSMC rimanenti cambiano da un fenotipo contrattile ad uno sintetico a causa della perdita dei miofilamenti e della down-regolazione dei geni codificanti per il citoscheletro e per le proteine miofibrillari (Mao et al., 2015). Oltre a produrre livelli patologici di proteine MMP, queste VSMC sintetiche colpiscono l'integrità della parete aortica dato che sono considerevolmente meno mobili della loro controparte contrattile. Infatti, i prodotti degradati di proteoglicani e glicosaminoglicani si accumulano nelle risultanti regioni deplete di VSMC e producono stress intramurale, che potrebbe ulteriormente indebolire la parete aortica ostacolando le normali interazioni cellula-matrice ed alterando la sua microstruttura a strati (Roccabianca et al., 2014). Infine, è stato dimostrato che le VSMC danneggiate o stressate secernono chemochine che richiamano cellule infiammatorie alla parete aortica; tuttavia, il preciso contributo di questa risposta infiammatoria alla patogenesi di TAA rimane tuttora elusivo.

Per quanto riguarda le cellule endoteliali, i meccanismi patologici che le coinvolgono non sono stati studiati in maniera estensiva. Nei tessuti aneurismatici aortici di pazienti con TAA, la proliferazione endoteliale è ridotta e l'espressione endoteliale di proteine della ECM e dell'apparato contrattile sono alterate (Malashicheva et al., 2016). Pertanto, si ipotizza che le cellule endoteliali influenzino la struttura e l'attività delle VSMC mediando un ulteriore indebolimento della parete aortica.

Basi genetiche di TAA

a) Forme sindromiche

Sono state descritte varie condizioni multisistemiche, caratterizzate da modalità di trasmissione autosomica dominante, autosomica recessiva, o X-linked, che si presentano con patologia aneurismatica dell'aorta, in particolare la sindrome di Marfan (MFS), la sindrome di Loeys–Dietz (LDS), la sindrome di Shprintzen–Goldberg (SGS), e le sindromi di Ehlers–Danlos (EDS).

La **MFS** è una patologia del tessuto connettivo caratterizzata da problematiche scheletriche (lassità legamentosa ed iperaccrescimento scheletrico), oculari (ectopia lentis e miopia), cutanee (strie) e cardiovascolari (aneurisma della radice aortica o dissezione e prolasso della valvola mitrale). Nel 1991 è stato identificato il gene causativo, *FBNI*, codificante per la fibrillina 1, e da allora sono state descritte più di 1850 diverse mutazioni localizzate diffusamente su tutto il gene e che spiegano approssimativamente il 95% di tutti i casi di MFS (Loeys et al., 2004). La fibrillina 1 rappresenta una glicoproteina dell'ECM richiesta per la formazione delle microfibrille e per il supporto elastico e strutturale dei tessuti. L'aneurisma aortico nella MFS è tipicamente predominante a livello dei seni di Valsalva; l'aorta addominale e discendente possono essere coinvolte in aneurismi in circa il 10% dei pazienti, generalmente dopo l'occorrenza di una dilatazione della radice aortica, sebbene siano stati riportati rari pazienti con MFS con dissezione di tipo B come prima presentazione (Engelfriet et al., 2006).

Sebbene i fenotipi di **LDS** e **SGS** presentino considerevoli sovrapposizioni con quello di **MFS**, queste sindromi hanno caratteristiche distintive. La **LDS** è tipicamente associata ad ipertelorismo, ugola bifida o palatoschisi, e tortuosità arteriosa con diffusi aneurismi aortici che tendono a disseccare a diametri minori. I pazienti con **SGS** comunemente presentano craniosinostosi, difficoltà di

apprendimento, e ipotonia dei muscoli scheletrici. Ad oggi sono stati identificati 6 geni associati a LDS: *TGFBR1* (Loeys et al., 2005), *TGFBR2* (Loeys et al., 2005), *SMAD2* (Micha et al., 2015), *SMAD3* (van de Laar 2011), *TGFB2* (Lindsay et al., 2012; Boileau et al., 2012), e *TGFB3* (Bertoli-Avella et al., 2015). Questi geni codificano per importanti regolatori del pathway di segnalazione del TGF β , come citochine, recettori, o effettori intracellulari. Ad oggi non è emersa nessuna significativa correlazione genotipo-fenotipo e tutte le caratteristiche inizialmente descritte nei pazienti con mutazioni in *TGFBR1* e *TGFBR2* sono ora state associate a mutazioni anche negli altri geni associati a LDS successivamente identificati. *SMAD3*, *TGFBR1*, e *TGFBR2* sembrano causare i fenotipi cardiovascolari più severi, mentre gli altri geni si possono presentare con caratteristiche cardiovascolari lievi. Recentemente, sono state identificate mutazioni loss-of-function in *BGN* come causative di una severa condizione X-linked LDS/MFS-like (Meester et al., 2016). I soggetti maschi descritti con questa mutazione presentano TAA giovanile o ad esordio precoce, ipertelorismo, deformità del petto, ipermobilità delle articolazioni, contratture, e lieve displasia scheletrica. Nelle femmine la severità clinica della patologia si presenta in un continuum. *BGN* codifica per il biglicano, un piccolo proteoglicano ricco in leucina coinvolto nell'assemblaggio e mantenimento di ECM attraverso l'organizzazione della fibrillogenesi del collagene (Halper, 2014; Douglas et al., 2006). Oltre a questa funzione strutturale, il biglicano interagisce con una varietà di fattori di crescita e citochine incluso il TGF β (Hildebrand et al., 1994; Kolb et al., 2001). Un dato interessante è che alcuni individui con caratteristiche peculiari di LDS non presentano mutazioni nei geni attualmente noti, suggerendo quindi che rimangono da identificare ulteriori geni causativi di LDS.

In confronto a LDS, **SGS** è più omogeneo geneticamente e infatti circa il 90% dei probandi presenta una mutazione de novo in *SKI* (codificante per l'oncogene ski) (Schepers et al., 2015; Doyle et al., 2012; Carmignac et al., 2012), che rappresenta un regolatore negativo del signalling TGF β SMAD dipendente.

Infine, anche le **EDS** presentano una sovrapposizione clinica con le condizioni sopra descritte. Le EDS sono caratterizzate da iperestensibilità cutanea o traslucenza, con cicatrici atrofiche e facilità alle ecchimosi, fragilità tissutale (vascolare o rotture intestinali), ipermobilità articolare e lussazioni. La patologia aneurismatica aortica è presente in circa il 25% dei pazienti con EDS (Wenstrup et

al., 2002), con prevalenza particolarmente alta nei pazienti con EDS vascolare. Oltre il 95% dei pazienti con EDS vascolare presenta una mutazione nel gene *COL3A1* (Schwarze et al., 2001); occasionalmente occorrono mutazioni in *COL1A1* e *COL5A1*, geni che normalmente causano artrocalasia e il sottotipo classico di EDS, (Monroes et al., 2015). Questi tre geni codificano collagene che, formando fibrille di collagene omotrimeriche o eterotrimeriche, producono ECM degli organi interni e della pelle fornendo quindi forza tensiva ai tessuti. EDS cifoscoliotico e EDS con eterotopia nodulare periventricolare sono due condizioni in cui la rottura vascolare occorre sporadicamente (Rohrbach et al., 2011; de Wit et al., 2011). Queste condizioni sono state associate rispettivamente a mutazioni recessive nel gene *PLOD1* e a mutazioni X-linked nel gene *FLNA* (Yeowell et al., 2000; Fox et al., 1998). *PLOD1* codifica per l'enzima ECM procollagene lisina-2-oxoglutarato-5-diossigenasi1, che è coinvolto nel cross-linking del collagene intermolecolare. *FLNA* codifica per la filamina a che rappresenta un componente del citoscheletro che connette l'apparato contrattile VSMC alla membrana delle cellule e/o all'ECM.

b) Forme non sindromiche

I pazienti con TAA non sindromico possono essere suddivisi in due gruppi in base alla presenza o l'assenza di una storia familiare positiva. Rispetto ai pazienti con TAA sporadico, i pazienti con TAA familiare (FTAA) hanno tipicamente una patologia aneurismatica aortica più precoce (57 anni versus 64 anni), a più veloce progressione (tasso di crescita annuale di 0,22 cm versus 0,03 cm), e hanno una predisposizione genetica più forte (Coady et al., 1999).

Il modello ereditario dei FTAA è generalmente autosomico dominante. Ad oggi sono stati identificati due loci associati (Vaughan et al., 2001; Guo et al., 2001) e mutazioni causali in più di 10 geni diversi. Tuttavia, circa il 75-80% di tutti i casi di FTAA non è spiegato da mutazioni nei geni noti, indicando quindi che l'eziologia genetica sottostante è fortemente eterogenea.

Il gene principale ad oggi identificato è *ACTA2*, che codifica per l'actina del muscolo liscio aortico, che rappresenta una proteina coinvolta nel mantenimento della conformazione normale delle arterie attraverso la formazione di filamenti contrattili. Mutazioni in *ACTA2* spiegano circa il 14-21% dei FTAA; tuttavia la variabilità genetica di *ACTA2* è associata a TAA con bassa penetranza

(50% circa) (Guo et al., 2007; Morisaki et al., 2009). Il fenotipo clinico, oltre a TAA, può essere caratterizzato da ictus, patologia coronarica precoce, AAA, valvola aortica bicuspidale, patent ductus arteriosus, livedo reticularis, iris flocculi (Guo et al., 2009).

Rispetto ad *ACTA2*, gli altri geni identificati contribuiscono in misura molto minore all'eziologia di FTAA (<1% dei pazienti). Tra questi, il primo ad essere stato identificato è *MYH11* (Zhu et al., 2006) che codifica per la miosina 11, nota anche come catena pesante della miosina del muscolo liscio, che costituisce il principale componente del filamento spesso contrattile delle VSMC, fondamentale per la contrazione delle VSMC. Mutazioni in *MYH11* sono state identificate soprattutto in pedigree in cui TAA è associato a patent ductus arteriosus (Pannu et al., 2007); ad oggi è nota una sola famiglia con mutazioni in *MYH11* col solo fenotipo vascolare di TAA (Takeda et al., 2015) ed è stata riportata penetranza incompleta (Pomianowski et al., 2015). Inoltre, *MYH11* presenta un considerevole numero di varianti genetiche a significato ignoto.

Un altro gene causativo di FTAA è *MYLK* (Wang et al., 2012; Hannuksela et al., 2016) che codifica per la chinasi della catena leggera della miosina del muscolo liscio che media l'iniziazione dell'accorciamento contrattile delle VSMC con l'interazione di complessi calcio-calmodulina. Ad oggi, sono note solo 3 famiglie con mutazioni loss-of-function in questo gene; pertanto, non è possibile ancora delineare il fenotipo associato a mutazioni in *MYLK*. Un dato rilevante, ad ogni modo, è che nella maggioranza dei pazienti con mutazioni in *MYLK* con dissezione è stata rilevata una assente o piccola dilatazione aortica.

Nel gene *PRKG1* è stata identificata una singola mutazione gain-of-function a penetranza completa (Arg177Gln) stimata responsabile dell'1% di casi di FTAA (Guo et al., 2013). *PRKG1* codifica per la chinasi 1 cGMP-dipendente, che ha un ruolo importante nel rilassamento del tono del muscolo liscio. Soggetti con questa mutazione presentano una dissezione ad una età relativamente giovane (15-51 anni), a diametri tra 4,3 cm e 5,7 cm; possono inoltre presentare tortuosità arteriosa ed ipertensione.

L'aploinsufficienza del gene *MFAP5* è un'altra causa genetica di FTAA (Barbier et al., 2014). Questo gene codifica per un componente ECM chiamato proteina 5 associata alle microfibrille che localizza nelle microfibrille contenenti fibrillina e può reversibilmente legare fattore di crescita come il TGFβ e proteina

morfogenetica ossea. La penetranza sembra essere incompleta dato che solo il 60% dei soggetti con questa mutazione è affetto; sono anche state osservate lievi caratteristiche sistemiche e fibrillazione atriale parossistica in alcuni portatori, tuttavia l'esiguo numero delle famiglie descritte con mutazioni in *MFAP5* non consente di escludere che si tratti piuttosto di reperti incidentali.

Mutazioni loss-of-function del gene *MAT2A* sono state identificate come predisponenti a FTAA (Guo et al., 2015). L'enzima codificato da *MAT2A*, S-adenosil-metionina-sintetasi isoforma tipo 2 catalizza il trasferimento di adenosil ATP derivato alla L-metionina alla S-adenosil-metionina-sintetasi che ha un ruolo centrale nella metilazione del DNA, RNA e proteine. Ad oggi è stata identificata solo un'estesa famiglia con mutazioni in *MAT2A*. L'età media dei pazienti diagnosticati con FTAA è 50 anni (range 37-56 anni), e la penetranza è bassa con solo 7 portatori di mutazione su 15 maggiori di 30 anni affetti. Pertanto, sembrerebbe che lo sviluppo di TAA in pazienti con mutazioni loss-of-function in *MAT2A* richieda un trigger addizionale genetico o ambientale. Ad esempio, nel pedigree riportato da Guo et al., gli individui affetti appartenenti ad un ramo del gentilizio presentavano anche valvola aortica bicuspidata che potrebbe quindi essere considerato un fattore aggiuntivo. Più precisamente, anomalie della valvola aortica risultano in un flusso ematico valvolare aberrante che può accelerare ulteriormente lo sviluppo di TAA applicando uno sforzo meccanico alla parete aortica (Loscalzo et al., 2007).

In due studi pubblicati nel 2016, sono stati suggeriti *FOXE3* e *LOX* come geni correlati a FTAA (Kuang et al., 2016; Guo et al., 2016). Non sono ancora disponibili informazioni dettagliate sul ruolo del fattore di trascrizione codificato da *FOXE3* nel sistema cardiovascolare, ma studi preliminari nei topi suggeriscono che questa proteina sia essenziale per stabilire una normale quantità, densità, e differenziazione delle VSMC nello sviluppo dell'aorta ascendente (Kuang et al., 2016). Tutte le mutazioni *FOXE3* identificate riguardano aminoacidi C-terminali nel dominio di legame col DNA. Mutazioni dominanti di *FOXE3* nel dominio N-terminale o al di fuori di esso causano invece una patologia oculare (Iseri et al., 2009). È interessante notare che ad oggi un solo portatore di sesso maschile è stato identificato con TAA (Kuang et al., 2016) ed il meccanismo che contribuisce a questo fenomeno legato al sesso non è al momento noto.

LOX codifica per la proteina lisina 6 ossidasi, un enzima extracellulare che inizia il cross-linking del collagene e dell'elastina. Le mutazioni identificate in questo gene possono condurre ad aploinsufficienza oppure possono coinvolgere aminoacidi localizzati nel dominio catalitico *lox* altamente conservato (Guo et al., 2016; Lee et al., 2016). I portatori di mutazione in *LOX* presentano frequentemente valvola aortica bicuspid (circa 15 % dei casi).

Infine, un piccolo sottogruppo di pazienti con FTAA sono spiegati da mutazioni in alcuni dei geni sindromici noti come *FBNI* (Milewicz et al., 1996; Keramati et al., 2010; Regalado et al., 2016), *SMAD3* (Regalado et al., 2011), *TGFB2* (Gago-Diaz et al., 2014) e *TGFBR2* (Hasham et al., 2003; Pannu et al., 2005). Pertanto, è evidente come mutazioni in questi geni risultino in uno spettro di patologia molto ampio con FTAA ad un'estremità e MFS e LDS all'estremità più severa.

Pathways patogenetici

L'estensiva ricerca sulla patogenesi dei TAA ha evidenziato alterazioni a carico dell'ECM, del signalling del TGF β , e dei componenti cellulari dell'apparato contrattile delle VSMC. Su questi obiettivi si studiano nuove opzioni terapeutiche.

a) Struttura della matrice extracellulare

Tra le componenti strutturali dell'aorta, le fibre elastiche ed il collagene fibrillare costituiscono il 60% del peso secco dell'ECM. Il collagene serve ad impedire il collassamento meccanico dell'aorta, costantemente soggetta alla pressione arteriosa, mentre le fibre elastiche servono a ripristinare la parete del vaso alle condizioni di riposo dopo l'espansione sistolica. La corretta formazione di cross-linking intramolecolare e intermolecolare è indispensabile per l'assemblaggio del collagene e delle fibre elastiche; tale processo richiede interazioni tra collagene, elastina, fibronectina, proteoglicani e componenti microfibrillari. Negli ultimi 15 anni sono state identificate in pazienti con TAA mutazioni in geni codificanti per i componenti ECM, come il collagene aortico (*COL1A1*, *COL3A1*, e *COL5A1*) (Schwarze et al., 2001; Monroe et al., 2005), le proteine microfibrillari ed i costituenti glicoproteici (*FBNI* e *MFAP5*) (Dietz et al., 2001; Barbier et al., 2014), così come proteine coinvolte nel cross-linking

collagene-collagene e collagene-proteoglicani (*BGN*, *LOX*, e *PLOD1*) (Meester et al., 2016; Yeowell et al., 2000; Guo et al., 2016). Questi geni predispongono a patologia aneurismatica aortica colpendo la rigidità ed elasticità, e quindi la forza, della parete aortica. Nel passato, difetti genetici che alterano la formazione e l'integrità di ECM erano considerati causativi solamente di TAA sindromico; tuttavia, questa visione è cambiata con la scoperta di geni come *MFAP5* e *LOX* (Barbier et al., 2014) associati a FTAA non sindromico.

b) TGFβ signalling

La disregolazione del signalling del TGFβ è stato inizialmente associato a TAA nel contesto di MFS (Neptune et al., 2003; Ng et al., 2004; Habashi et al., 2006; Cohn et al., 2007). In considerazione del ruolo strutturale della fibrillina 1 nell'ECM, si è ritenuto inizialmente che mutazioni in questa proteina fossero causative della fragilità del tessuto aortico attraverso la disintegrazione e frammentazione delle fibre del tessuto connettivo. Questo modello non spiegava però altri sintomi della MFS, come l'iperaccrescimento scheletrico ed il prolasso della valvola mitrale. Studi successivi sulla patologia polmonare in topi con deficit di fibrillina 1 sono stati decisivi sulla conoscenza dei meccanismi patologici di TAA. Infatti, durante lo sviluppo polmonare un aumento del TGFβ circolante e dei suoi effettori a valle (SMAD2/3 fosforilati) coincideva con la mancata settazione primitiva degli alveoli distali. La somministrazione di anticorpi neutralizzanti il TGFβ in vivo recuperava il fenotipo polmonare normale. In maniera analoga, è stato dimostrato che un signalling del TGFβ aberrante era all'origine della miopatia e del prolasso della valvola mitrale e del TAA. Ad oggi, la fibrillina 1 contenuta nelle microfibrille è largamente riconosciuta per regolare la biodisponibilità del TGFβ avendo come target il grande complesso latente nell'ECM (che comprende il ligando TGFβ maturo, il propeptide TGFβ e la proteina latente legante il TGFβ). Pertanto il deficit di fibrillina 1 attribuibile a mutazioni in *FBNI* conduce a un continuo rilascio di ligandi TGFβ, che attiva in maniera sproporzionata il signalling a valle del TGFβ (Franken et al., 2013). Negli ultimi 10 anni, l'identificazione di mutazioni loss-of-function nei geni che causano LDS e SGS e che codificano per recettori del TGFβ (*TGFBR1* e *TGFBR2*), ligandi del TGFβ (*TGFB2* e *TGFB3*), effettori a valle (*SMAD2* e *SMAD3*), e inibitori del TGFβ (*SKI*), hanno ulteriormente stabilito un

ruolo alla disregolazione del signalling del TGF β nel TAA sindromico (Verstraeten et al., 2016). Analogamente a MFS, e come atteso dalla funzione inibitoria di *SKI*, la parete aortica ed i fibroblasti del derma dei pazienti con SGS e mutazione in *SKI* mostrano una sostanziale up-regolazione del signalling del TGF β (Doyle et al., 2012). In maniera paradossa, il signalling del TGF β è attivato invece che diminuito nella parete aortica di pazienti con mutazioni loss-of-function in *SMAD2*, *SMAD3*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBRI*, e *TGFBRI2*, come dimostrato dal riscontro di elevati livelli di espressione di smad2 fosforilato, ERK2, ERK1, TGF β 1, collagene, e CTGF. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare questi riscontri apparentemente in opposizione, ma sono necessari ulteriori studi per delineare il processo in dettaglio (Verstraeten et al., 2016). Un'ipotesi riguarda l'interruzione del feedback autoinibitorio dato dalla disfunzione di SMAD2, SMAD3, TGF β 2, TGF β 3, TGF β R1, TGF β R2, e risultante in un'eccessiva secrezione di TGF β ed una sproporzionata attivazione del signalling non canonico del TGF β (Bolar et al., 2012). Oppure, dato che i pazienti con LDS o SGS mostrano un marcato aumento dell'espressione del TGF β , potrebbe essere coinvolto anche un cambio tra il signalling TGF β 2/TGF β 3-driven al TGF β 1-driven (Lindsay et al., 2012; Doyle et al., 2012). Infine, un'altra ipotesi suggerisce il coinvolgimento dell'effetto autonomo non cellulare in base all'osservazione che i confini dei siti dei foglietti embrionali corrispondono alle regioni anatomiche colpite nella patologia aneurismatica aortica sindromica TGF β -correlata (cioè la radice aortica e polmonare, l'aorta iuxtaduttale e l'aorta addominale sopra renale) (Lindsay et al., 2012). La linea cellulare più vulnerabile della radice aortica, le VSMC derivanti dal secondo foglietto cardiaco embrionale, potrebbe essere colpita in maniera sproporzionata dal down-signalling canonico del TGF β disfunzionale, risultando in un aumento compensatorio di espressione e rilascio del TGF β cellulare-specifico. Come risultato, il signalling del TGF β potrebbe essere stimolato nelle adiacenti, seppur intrinsecamente meno vulnerabili, VSMC cardiache derivate dalle creste neurali (Gallo et al., 2014).

Se da un lato difetti genetici nei componenti del pathway del signalling TGF β sono generalmente ritenuti associati a forme sindromiche di TAA, un aumentato signalling del TGF β è stato osservato anche nella parete aortica di pazienti con TAA non sindromico e mutazioni in *MYH11* o *ACTA2* (Renard et al., 2013). È stato ipotizzato che il deficit di *MYH11* o *ACTA2* impedisca il corretto

assemblaggio dei filamenti di miosina e actina rispettivamente, conducendo a difetti della fibrillogenesi della fibronectina e successiva formazione di microfibrille contenenti fibrillina 1. Pertanto, la capacità dell'ECM di sequestrare TGF β latente diminuisce e il signalling del TGF β risulta incrementato. Anche in questo caso, ulteriori studi sono necessari per capire nel dettaglio il coinvolgimento del signalling del TGF β in questi pazienti.

c) Apparato contrattile delle cellule vascolari muscolari lisce

Con l'identificazione di mutazioni in *ACTA2*, *MYH11*, *MYLK*, e *PRKG1* in pazienti con FTAA, è stato direttamente implicato il coinvolgimento di alterazioni a carico dell'apparato contrattile delle VSMC nell'eziologia della patologia aneurismatica aortica non sindromica. Queste mutazioni, infatti, rendono l'aorta meno capace di resistere alla forza biomeccanica di un'alterata contrazione delle VSMC.

I maggiori costituenti dell'apparato contrattile delle VSMC sono i filamenti spessi e sottili del citoscheletro che sono principalmente composti da miosina e actina rispettivamente. La miosina delle VSMC consiste in due catene pesanti (come la miosina 11), due catene leggere, e due catene leggere regolatorie; con lo stimolo meccanico il calcio entra nella cellula e lega la calmodulina; il complesso calcio-calmodulina successivamente attiva la chinasi della catena leggera della miosina del muscolo liscio (codificata da *MYLK*), che in turno fosforila il complesso regolatorio della catena leggera della miosina. Questa fosforilazione promuove l'attività ATPasica actina dipendente della testa motrice globulare della miosina conducendo alla contrazione delle VSMC, iniziando il movimento dei filamenti spessi e sottili spessi uno su sull'altro. Il rilasciamento delle VSMC è mediato da eventi di signalling che mediano la defosforilazione della miosina (come quelli coinvolgenti la chinasi 1 cGMP-dipendente (Surks et al., 2007).

Aortopatia e valvola aortica bicuspidale

Razionale ed obiettivo dello studio

La valvola aortica bicuspidale (BAV) è la più frequente malformazione cardiaca, con una prevalenza dello 0,5-2% della popolazione generale (Roberts, 1970; Tutar et al., 2005), con un rapporto maschi-femmine di 3 a 1. La presentazione clinica della BAV è fortemente eterogenea, spaziando da pazienti che presentano problematiche in età infantile a pazienti adulti; tuttavia, una correzione chirurgica si rende necessaria nella maggior parte dei pazienti. La disfunzione valvolare può manifestarsi con stenosi e/o insufficienza con severità variabile. Inoltre, anche in assenza di una significativa disfunzione valvolare, spesso si evidenzia una dilatazione dell'aorta ascendente con un'incidenza tra il 30 e il 70% (Losenno et al., 2012).

Nei primi studi, la morfologia valvolare bicuspidale veniva imputata principale causa di disfunzione valvolare, conducendo ad una perturbazione emodinamica causativa di dilatazione aortica; tuttavia, diversi studi successivi hanno dimostrato come l'aortopatia e la BAV siano manifestazioni indipendenti, con un verosimile difetto genetico comune sottostante (Loscalzo et al., 2007). Difatti, è stata proposta una nuova terminologia di "sindrome aortopatia-BAV" (Sorrell et al., 2012).

Studi familiari hanno evidenziato una modalità di trasmissione autosomica dominante a penetranza incompleta ed espressività variabile (Huntington et al., 1997; Loscalzo et al., 2007; Biner et al., 2009), suggerendo quindi una base genetica della malattia. I geni causativi sono tuttora in larga parte sconosciuti.

Mutazioni nel gene *ACTA2* sono state associate a predisposizioni a TAA e ad altre condizioni vascolari (Guo et al., 2007; Guo et al., 2009). Mutazioni nell'amminoacido in posizione 179 di *ACTA2* sono responsabili di un fenotipo severo, dovuto ad una disfunzione multisistemica di cellule muscolari lisce e causativo di patologia vascolare, midriasi congenita, disfunzione vescicale, malrotazione intestinale, ipoperistalsi.

Ad oggi nessuno studio ha analizzato in maniera specifica il ruolo di *ACTA2* nella patologia aortopatia-BAV. Dopo il primo report di Guo et al., che suggeriva che *ACTA2* potesse essere responsabile fino al 14% di casi di TAA potenzialmente associati con BAV in alcuni pazienti, sono seguiti studi che hanno

evidenziato percentuali simili, rispettivamente 21% e 12% (Morisaki et al., 2009; Disabella et al., 2011). Tuttavia, nessun altro caso di BAV è stato più riportato.

Lo scopo di questa ricerca è quindi quello di studiare il ruolo di mutazioni di *ACTA2* e di eventuali altri geni noti nel fenotipo di aortopatia-BAV in una coorte di 20 pazienti. I pazienti sono stati sottoposti ad un attento esame obiettivo dismorfológico allo scopo di identificare possibili segni comuni che potessero correlare con la patologia cardiovascolare. Inoltre, è stata determinata la prevalenza della patologia BAV familiare sottoponendo ad ecocardiografia tutti i familiari di primo grado di ciascun probando. Infine, i casi familiari sono stati selezionati per analisi con esoma allo scopo di identificare possibili nuovi geni causativi.

Materiali e metodi

a) Soggetti arruolati

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna.

Sono stati arruolati 20 probandi consecutivi con aortopatia TAA-BAV sottoposti a chirurgia della valvola aortica e dell'aorta ascendente presso l'U.O. Cardiochirurgia del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna, e di cui i familiari di primo grado fossero disponibili a partecipare. Sono stati esclusi dallo studio pazienti con sospetto di condizione sindromica. Ciascun probando ha dato il consenso informato allo studio ed è stato valutato presso U.O. Genetica Medica del Policlinico Sant'Orsola Malpighi di Bologna in sede di consulenza genetica con comprendente anamnesi personale, anamnesi familiare con ricostruzione dell'albero genealogico ed esame obiettivo dismorfológico.

I familiari di primo grado, di età maggiore di 18 anni, sono stati arruolati allo studio dopo aver firmato il consenso informato. Anche i familiari sono stati esaminati nel contesto di una consulenza genetica e sono stati sottoposti ad ecocardiografia per verificare l'eventuale presenza di BAV e/o TAA asintomatico. L'ecocardiografia è stata eseguita presso l'U.O. Cardiologia del Policlinico Sant'Orsola Malpighi di Bologna attraverso protocolli standard. I soggetti sono stati considerati affetti in presenza di BAV, TAA, dissezione dell'aorta, correzione chirurgica di TAA o sostituzione valvolare aortica.

b) Analisi mutazionale di ACTA2

Il DNA genomico è stato estratto, dopo essere stato isolato dal sangue periferico in EDTA, usando QIAmp DNA blood Mini Kit in base al protocollo del produttore (Quiagen, Valencia, CA). L'analisi mutazionale dell'intero gene *ACTA2* è stata eseguita attraverso il sequenziamento diretto bidirezionale di frammenti di DNA genomico amplificato con primers esoni-specifici basati sugli introni. La reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR) è stata eseguita attraverso Fast Start Taq DNA polymerase dNTPack kit 107 (Roche), e il sequenziamento bidirezionale di ciascun amplicone è stato eseguito sull'analizzatore ABI 3730 DNA analyzer 108 (Applied Biosystems). I risultati della sequenza sono stati analizzati utilizzando il software 110 Sequencer (Gene Code Corporation) allineando la sequenza al riferimento genomico umano di *ACTA2*.

c) Analisi NGS dei geni correlati a BAV tramite targeted panel

Le analisi di Next Generation Sequencing (NGS) sono state eseguite con sequenziatore MiSeq (Illumina, SanDiego, CA) su DNA genomico purificato (50 ng) utilizzando il protocollo provvisto dal TruSight Cardio Sequencing Kit (Illumina) che ha come targets 174 geni causativi di patologie cardiovascolari. Per ciascun paziente, i pool di file VCF sono stati analizzati con il software VariantStudio (Illumina). Poiché la maggioranza dei 174 geni non risulta rilevante per BAV, sono state prese in considerazione varianti a carico di un sottogruppo di geni appartenenti all'intersezione tra il pannello commerciale e la lista (HP_0001647) generata dal server Human Phenotype Ontology (<http://human-phenotype-ontology.github.io/>) utilizzando "Bicuspid Aortic Valve" come termine di ricerca. Questa intersezione contiene i seguenti geni: *ABCC9*, *ACTA2*, *CBL*, *ELN*, *FBNI*, *FBN2*, *MYH11*, *MYH7*, *MYLK*, *NOTCH1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBR1* e *TGFBR2*. Le varianti identificate sono state ulteriormente annotate sui database di riferimento OMIM, ClinVar, ExAc e HGMD. Poiché la copertura dell'analisi è molto alta (>100x), non è stata eseguita una conferma attraverso sequenziamento Sanger delle varianti identificate.

d) Analisi dell'esoma

L'analisi dell'esoma è stata condotta presso il laboratorio del Centro di Genetica Medica dell'Università di Antwerp (Belgio) su sequenziatore HiSeq 2000 (Illumina) e kit di arricchimento Nextera enrichment kit (Illumina) con protocolli come da istruzioni del produttore.

I dati grezzi sono stati processati utilizzando una pipeline sviluppata in-house e basata sul Galaxy, seguita da chiamata delle varianti con Genome Analysis Toolkit Unified Genotyper (DePristo et al., 2011). Le varianti sono state successivamente annotate e filtrate con il database VariantDB sviluppato in-house (Vandeweyer et al., 2014) per parametri qualitativi, modello di ereditarietà dominante, effetto sul trascritto (esclusione di varianti sinonime), effetto predittivo di patogenicità, frequenza allelica nella popolazione (<3%). Gli elenchi di varianti ottenuti sono stati studiati tramite tools di annotazione (GATK, Annovar, GeneOntology) con un approccio analitico senza strumenti di prioritizzazione. Sono state selezionate varianti codificanti eterozigoti o su regione di splicing (+/- 2 bp dalla giunzione esone-introne per sostituzioni nucleotidiche e +/- 5 per delezioni o inserzioni di bp multiple) con un equilibrio allelico compreso tra 0,25 e 0,85, ed una minima copertura di 10 reads. Sono state incluse varianti appartenenti ad almeno una delle seguenti categorie: varianti uniche (assenti nel database Exome Aggregation Consortium (ExAC)), varianti con una frequenza allelica minore (MAF) <3% in ExAC. Varianti sinonime al di fuori dei siti di splicing non sono state prese in considerazione.

Per ciascuna famiglia è stato analizzato il probando e un familiare di primo grado affetto da BAV e/o TAA. È stato preso in considerazione un elenco di varianti uniche ed un elenco di varianti con MAF<3% in eterozigosi. Gli insiemi delle varianti ottenute per entrambi probando e familiare sono stati intersecati, ed il sottoinsieme così generato è stato ulteriormente analizzato per ciascuna variante.

Ciascuna variante è stata studiata nelle sue caratteristiche intrinseche (effetto patogenetico, conservazione filogenetica), tecniche (coverage e qualità), e geniche (espressione tissutale, funzione genica, eventuali modelli murini, manoscritti indicizzati con informazioni aggiuntive); a tal scopo sono stati utilizzati i principali software e database dedicati (PolyPhen, SIFT, Mutation

Taster, CADD, GERP, GeneCard, Uniprot, BioGPS, JAXmice, proteinAtlas, NCBI, EVS).

e) Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando con il software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le variabili continue sono state espresse con la mediana e confrontate col Mann-Whitney U-test. Le variabili di categoria sono state espresse come percentuali e confrontate con χ^2 test o Fisher's exact test laddove appropriato. Un valore di probabilità a due code <0.05 è stato ritenuto indicativo di significatività statistica.

Risultati

a) Analisi di sequenziamento di ACTA2 ed analisi NGS dei geni correlati a BAV

Il sequenziamento di tutti e 9 gli esoni e delle regioni di splicing del gene *ACTA2* nei 20 probandi non ha evidenziato alcuna mutazione patogenetica. Il riscontro di polimorfismi in eterozigosi ha escluso la possibilità di delezioni dell'intero gene, ma non ha escluso la possibilità di delezioni parziali o intrageniche.

L'analisi NGS con pannello targeted per i geni correlati a BAV ha sequenziato tutti i geni con una alta copertura ($>100x$) in tutti i 20 probandi e non ha identificato alcuna mutazione nota. La tabella 1 elenca le varianti di significato incerto (VUS) identificate e la loro caratteristiche di predizione di patogenicità in base a diversi software (PoliPhen, SIFT, MutTaster, GERP, CADD).

b) Analisi dell'esoma

Le famiglie analizzate con esoma sono nella figura 1. Per ciascuna famiglia è stata ottenuta una media di 67350 varianti, con l'analisi di filtraggio sono state ottenute rispettivamente una media di 263 varianti uniche di cui 145 in media in eterozigosi e 135 varianti MAF $<3\%$ di cui 123 in eterozigosi.

Non sono state identificate mutazioni note. Non sono state osservate varianti geniche condivise dalle diverse famiglie. L'analisi delle varianti geniche per ciascuna famiglia non ha evidenziato nessun gene potenzialmente candidato all'aortopatia BAV.

c) Dati clinici

La tabella 2 mostra le caratteristiche dei 20 pazienti arruolati nello studio: sono 19 maschi ed una femmina. L'età media alla diagnosi è 40,85 anni (minimo 18 anni, massimo 61) e l'età media alla chirurgia è 47,15 anni (minimo 19 anni, massimo 62). La morfologia BAV, descritta in 8 probandi, è di una fusione delle cuspidi coronarie destro-sinistro (RC-LC) in 7 probandi, tutti con un rafe; mentre un paziente presenta fusione della cuspidi coronarica sinistra e non coronarica (LC-NC). È stata evidenziata alta variabilità nella disfunzione valvolare: da funzionalità normale (5 su 20=25%), a insufficienza aortica severa o stenosi aortica. Insufficienza aortica è presente in 11 pazienti (4 lieve, 3 moderata, 4 severa), mentre la stenosi aortica è stata osservata in 2 pazienti. I 2 pazienti rimanenti presentano steno-insufficienza della valvola. In tutti e quattro i pazienti con stenosi aortica è stata evidenziata una valvola calcifica. Tre pazienti presentano anche disfunzione della valvola mitrale. Il diametro massimo medio dell'aorta ascendente è 49,65 mm (minimo 42 mm, massimo 61 mm).

15 pazienti sono stati sottoposti a sostituzione della radice aortica utilizzando graft composito con tecnica di Bentall, 3 pazienti sono stati sottoposti a procedura che risparmia la valvola aortica con tecnica di David, un paziente è stato sottoposto a sostituzione della valvola aortica con riposizionamento aortico sopra-coronarico, ed un paziente è stato sottoposto a sostituzione della valvola aortica e riduzione dell'aorta ascendente. L'analisi istologica dei campioni di tessuto aortico di 18 pazienti ha evidenziato alterazioni degenerative in tutti tranne in 3 che non erano significativamente alterati. Il grado di degenerazione della media era lieve in 8 su 18 (44,4%) moderato in 6 (33,3%) e severo in un solo paziente (5,6%). Non sono stati osservati segni di aortite o lesioni significative arteriosclerotiche.

All'esame obiettivo dei probandi non è stato evidenziato alcun segno distintivo di patologia del tessuto connettivo. Ad un follow-up medio di 4 anni tutti i pazienti sono rimasti stabili con le dimensioni aortiche. Due pazienti sono stati sottoposti a reintervento dovuto ad endocardite della valvola protesica.

Sono stati arruolati 77 familiari di primo grado: 15 genitori (19,5%, di età tra 56 e 84 anni), 35 fratelli/sorelle (45,5%, di età tra 33 e 83 anni), e 27 figli (35%). Per quanto riguarda il sesso: 35 sono femmine (45,5%) e 42 sono maschi

(54,5%). Tra questi, 4 presentano BAV, 3 BAV e TAA, 2 con TAA e valvola aortica normale tricuspide. In totale, quindi, 9 su 77 (11,7%) familiari di primo grado dei 20 probandi presentano BAV, TAA o entrambi. In uno di questi è stata posta nuova diagnosi di TAA senza BAV nel corso dell'ecocardiografia eseguita in occasione del presente studio; negli altri 8, invece, è stata confermata una diagnosi già nota.

Cinque casi su 20 sono stati identificati come familiari, vedi figura 1.

Due familiari di primo grado hanno ricevuto l'indicazione all'intervento cardiocirurgico per BAV e uno per BAV e TAA.

Nella famiglia 1 il probando è stato diagnosticato con aortopatia BAV all'età di 38 anni e sottoposto ad intervento chirurgico con tecnica di David all'età di 46 anni con dilatazione della radice aortica di 48 mm. Il padre presenta all'età di 80 anni aortopatia BAV con insufficienza aortica severa e dilatazione della radice aortica di 45 mm. I due fratelli presentano, rispettivamente all'età di 40 e 50 anni, dilatazione della radice aortica di 49 e 45 mm. I figli presentano diametri aortici nella norma; un figlio è deceduto per leucemia acuta.

Nella famiglia 2 il probando ha ricevuto diagnosi di BAV all'età di 18 anni ed ha subito intervento di sostituzione valvolare aortica con valvola protesica all'età di 34 anni per insufficienza; all'età di 53 anni è stato sottoposto ad intervento di Bentall per dilatazione della radice aortica (45 mm) e dell'aorta ascendente (61 mm). Il fratello affetto da aortopatia BAV presenta all'età di 53 anni una lieve insufficienza valvolare e valori di diametri aortici di 41 mm ai seni di Valsalva e di 42 mm all'aorta ascendente. Il figlio ha ricevuto all'età di 28 anni diagnosi di BAV con insufficienza valvolare severa ed indicazione all'intervento chirurgico; presenta inoltre lieve dilatazione della radice aortica (38 mm).

Nella famiglia 3 il probando ha ricevuto diagnosi di aortopatia BAV all'età di 53 anni ed è stato sottoposto ad intervento di Bentall all'età di 62 anni per steno-insufficienza aortica, dilatazione della radice aortica (43 mm) e dell'aorta ascendente (51 mm). Il fratello è stato sottoposto ad intervento di Bentall all'età di 75 anni per BAV e dilatazione della radice aortica (45 mm) e dell'aorta ascendente (52 mm).

Nella famiglia 4 il probando ha ricevuto diagnosi di BAV all'età di 30 anni ed è stato sottoposto ad intervento di Bentall all'età di 54 anni per steno-insufficienza valvolare aortica e dilatazione aortica della radice aortica (44 mm) e

dell'aorta ascendente (48 mm). Il fratello con BAV ha normali diametri aortici all'età di 65 anni. Il fratello deceduto presentava insufficienza renale cronica e BAV sottoposta a sostituzione protesica all'età di 49 anni; il decesso è avvenuto all'età di 61 anni per complicanze in seguito a trapianto cuore-rene resosi necessario per aggravamento delle condizioni sistemiche.

Nella famiglia 5 il probando è stato sottoposto ad un primo intervento cardiocirurgico all'età di 32 anni con plastica della BAV e sostituzione dell'aorta ascendente per dilatazione severa (57 mm) e ad un reintervento di Bentall dopo 6 anni resosi necessario per endocardite. La sorella è stata sottoposta ad intervento di Bentall all'età di 35 anni; la radice aortica era di 49 mm e l'aorta ascendente di 38 mm. Non è nota la causa del decesso del padre. Sono riportati due familiari nel ramo paterno con BAV e TAA, ma non sono disponibili informazioni ulteriori né documentazione clinica.

Tabella 1. Dettagli tecnici delle varianti identificate al pannello targeted.

ni: nessuna identificata

ID paziente	Copertura media	Copertura target 20x	Mutazioni note	Varianti identificate nel sottogruppo di geni	ExAc	PolyPhen-2	SIFT	GERP	MutTester	CADD-Phred
7328	120x	98.9%	ni	ni						
7568	346x	99.8%	ni	ni						
7705	253x	99.7%	ni	FBNI NM_000138.4:c.2228G>A NP_000129.3:p.Arg743His	novel	Benign (0.007)	Tolerated (0.3)	5.92	Disease causing (prob:0.947)	23.8
8038	278x	99.8%	ni	ELN NM_000501.2:c.593C>T NP_000492.2:p.Pro198Leu	0,0000248	Benign (0.281)	Tolerated (0.09)	2.46	Polymorphism (prob:0.6)	17.19
8326	297x	99.8%	ni	ni						
8833	296x	99.5%	ni	MYH11 NM_001040114.1:c.3361C>T NP_001035203.1:p.Arg1121Trp	0,00003	Probably damaging (0.986)	Deleterious (0)	4.47	Disease causing (prob:0.99)	34
11149	206x	99.5%	ni	ni						
9017	318x	99.7%	ni	TGFBR2 NM_001024847.2:c.1142G>A NP_001020018.1:p.Arg381Gln	0.0000165	Benign (0.427)	Deleterious (0.04)	4.85	Disease causing (prob:0.99)	24.3
9056	276x	99.7%	ni	TGFBR1 NM_004612.2:c.1433A>G NP_004603.1:p.Asn478Ser	0.0003	Benign (0.209)	Tolerated (0.09)	5.66	Disease causing (prob:0.99)	23.5
7632	255x	99.7%	ni	NOTCH1 NM_017617.3:c.1861C>T NP_060087.3:p.Arg621Cys	0.00003317	Probably damaging (1)	Deleterious (0.02)	5.24	Disease causing (prob:0.99)	34
8690	308x	99.8%	ni	LMNA NM_170707.3:c.1634G>A NP_733821.1:p.Arg545His	0.000088	Probably damaging (0.999)	Tolerated (0.36)	5.6	Disease causing (prob:0.99)	24
9096	317x	99.8%	ni	ni						
9244	200x	99.5%	ni	ni						
9936	173x	99.3%	ni	NKX2-5	0.003633	Benign	Tolerated	3.89	Known	29.9

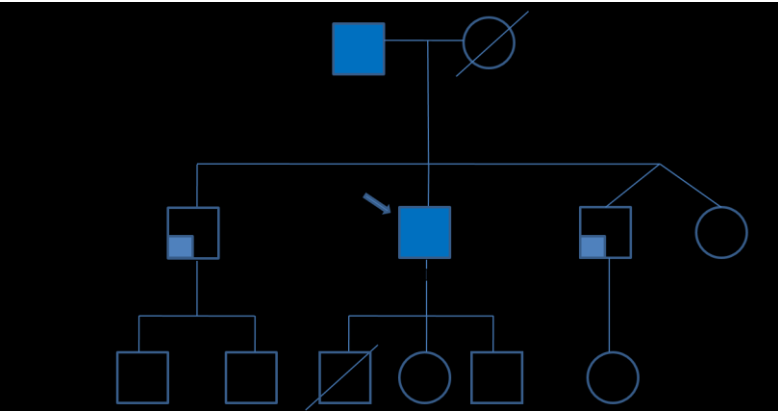
				NM_004387.3:c.73C>T NP_004378:p.Arg25Cys		(0.002)	(0.08)		disease mutation in ClinVar	
				NOTCH1 NM_017617.3:c.244G>A NP_060087.3:p.Val82Met	0.00039	Benign (0)	Tolerated (0.17)	-9.33	Polymorphism (prob:0.99)	0.003
10107	192x	99.4%	ni	ni						
10139	192x	99.5%	ni	TRPM4 NM_017636.3:c.2209G>A NP_060106.2:p.Gly737Arg	0.00219	Benign (0.003)	Tolerated (0.45)	-7.16	Polymorphism (0.99)	0.015
10136	87x	97.8%	ni	ni						
10312	184x	97.8%	ni	ni						
10678	211x	99.5%	ni	ni						
8813	326x	99.8%	ni	ni						

Tabella 2. Caratteristiche dei pazienti e risultati dello studio

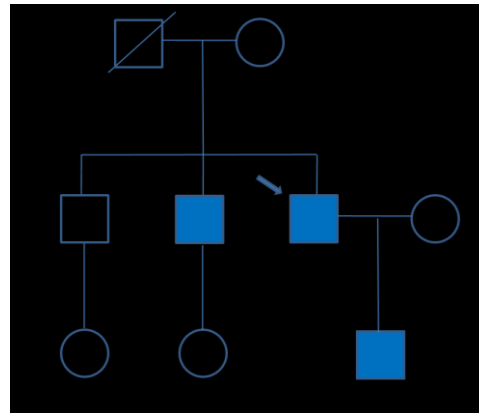
	SPORADICI		FAMILIARI	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Numero Totale	15	75	5	25
Maschi	14	93.3	5	100
Età (media ± SD)	45.9 ± 13.4		51 ± 9	
Iperensione	7	46.7	1	20
Ipercolesterolemia	3	20	3	60
Fumo	3	20	1	20
Obesità	-	-	-	-
Rafe	7		2	
<i>Morfologia della BAV:</i>				
RC-LC fusione	5		2	
LC-NC fusion	-		1	
<i>Patologia valvolare aortica:</i>				
Nessuna	2	13.3	3	60
Insufficienza	10	66.7	1	20
Stenosi	2	13.3	-	-
Stenosi + insufficienza	1	6.7	1	20
<i>Patologia valvolare mitralica:</i>				
Nessuna	12	80	5	100
Insufficienza	2	13.3	-	-
Stenosi	-	-	-	-
Stenosi + insufficienza	1	6.7	-	-
<i>Tipo di intervento chirurgico:</i>				
Bentall	11	73.3	4	80
David	2	13.3	1	20
AVR+SCAR	1	6.7	-	-
AVR+riduzione aorta ascendente	1	6.7	-	-
Endocardite	1	6.7	1	20
Reintervento	-	-	2	40

Figura 1: Alberi genealogici delle famiglie con aortopatia BAV. Sono indicati i soggetti su cui è stata eseguita analisi WES. I probandi sono indicati dalle frecce.

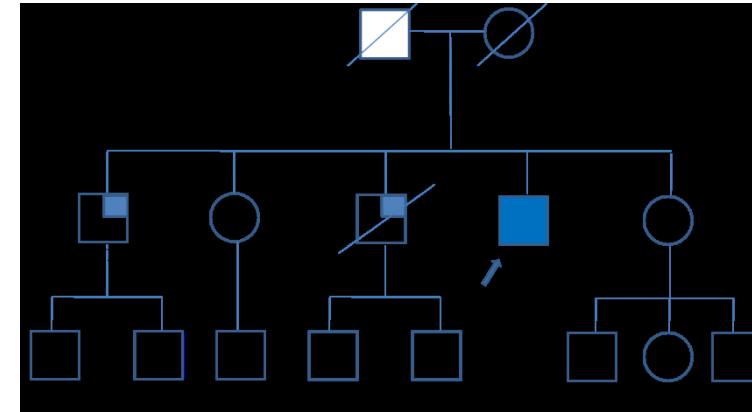
Famiglia 1



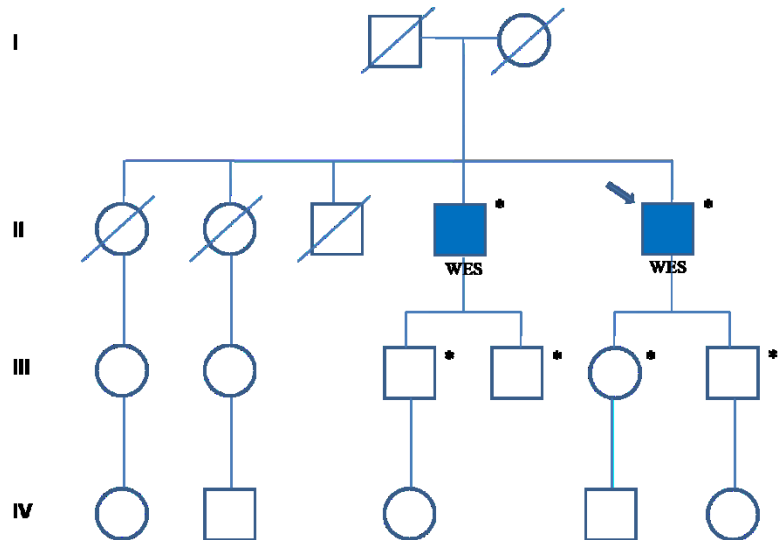
Famiglia 2



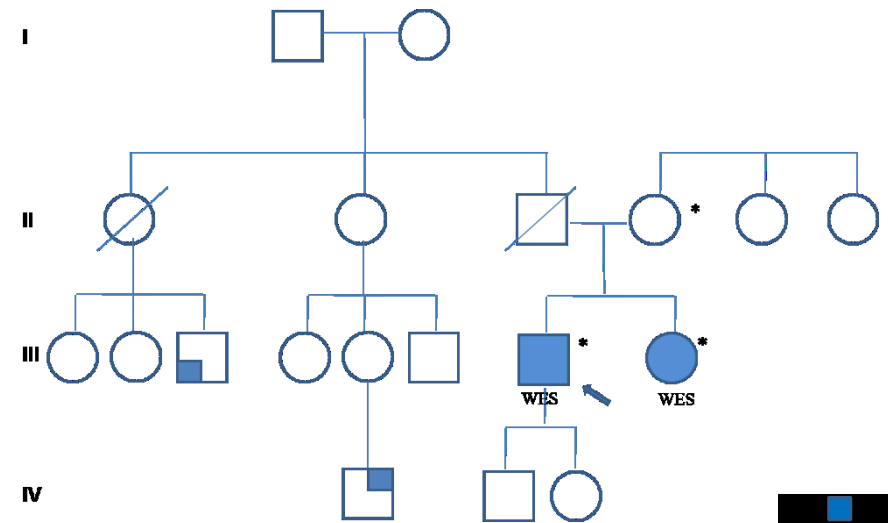
Famiglia 4



Famiglia 3



Famiglia 5



Discussione

BAV è una malformazione cardiaca congenita molto frequente associata a un alto rischio di sviluppare complicanze, tra cui condizioni severe come la dissezione aortica acuta o la rottura, con un elevato rischio di morbilità e mortalità perioperatoria.

Purtroppo ad oggi non sono disponibili marcatori clinici e biologici in grado di prevedere se, quando, ed in che grado si manifesteranno complicanze in un individuo con BAV né in casi sporadici né in casi familiari. L'identificazione di geni malattia o di altri marcatori biologici in queste famiglie permetterebbe una precoce diagnosi di BAV nei pazienti e nei familiari di primo grado a rischio. Pertanto, in tali pazienti, il monitoraggio della funzionalità valvolare e dei valori dei diametri aortici attraverso ecocardiogramma e CT e/o MRI, accompagnati da terapia farmacologica e chirurgia in elezione, potrebbero prevenire complicanze severe e quindi migliorare in maniera significativa la prognosi e la qualità di vita di questi pazienti. Una migliore conoscenza dei meccanismi alla base della patologia potrebbe quindi aiutare ad ottimizzare e personalizzare il follow-up dei pazienti diminuendo di conseguenza anche i costi dell'assistenza sanitaria.

Il clustering familiare in BAV e TAA è stato osservato frequentemente, fino al 20%, suggerendo quindi che la predisposizione genetica svolga un ruolo forte in queste patologie aneurismatiche e valvolari. Finora il solo gene associato a BAV in maniera convincente è codificante per il regolatore trascrizionale NOTCH1 (Garg et al., 2005; McKellar et al., 2007), sebbene il suo ruolo esatto nella patogenesi non è ancora stato ben delineato. È stata inoltre descritta qualche mutazione nel dominio di attivazione trascrizionale dei geni *GATA5* e *TGFBR2* (Padang et al., 2012; Milewicz et al., 2008; Girdauskas et al., 2011). Tuttavia, uno studio successivo volto a ricercare il ruolo di mutazioni germinali a carico dei geni *NOTCH1*, *GATA5*, *TGFBR1* e *TGFBR2*, in 11 casi familiari di BAV ha evidenziato due mutazioni in *NOTCH1* (Foffa et al., 2013). Infine, studi su grandi coorti di pazienti con BAV isolato e studi di linkage genome-wide o esomi in pedigree con diversi individui affetti hanno indicato che il contributo di diverse tipologie di variazioni genetiche possa essere più complesso: da polimorfismi comuni di singolo nucleotide a rare varianti copy-number e alterazioni cromosomiche (Prakash et al., 2016).

Mutazioni in *ACTA2* sono riportate causative di FTAA in 14 casi familiari su 98, e BAV è stato osservato in 3 pazienti appartenenti a 2 di queste 14 famiglie *ACTA2* positive.

ACTA2 è ancora considerato uno dei geni più frequentemente mutati nelle forme familiari di TAA, raramente associato a BAV; pertanto con questo studio si è voluto determinare se mutazioni *ACTA2* contribuiscono in maniera significativa al fenotipo comune di BAV associato a TAA in una coorte con 20 pazienti consecutivi con aortopatia BAV.

I risultati non hanno mostrato nessuna mutazione patogenetica nel gene *ACTA2* nei 20 probandi e, sebbene la coorte sia piccola, l'ipotesi di un ruolo significativo di *ACTA2* nell'aortopatia BAV non è supportato da questo studio. Considerando la frequenza dell'aortopatia BAV e l'assenza di studi successivi che confermano l'associazione tra *ACTA2* e BAV, i pochi casi riportati di BAV nelle famiglie *ACTA2*-mutate potrebbero essere un riscontro incidentale (Guo et al., 2007).

Inoltre, nel presente studio, usando un pannello NGS commerciale cardiovascolare, non è stata identificata alcuna mutazione in 13 geni associati a BAV sindromica ed isolata. *NOTCH1*, *TGFBR1* e *TGFBR2* sono inclusi nel sottoinsieme dei geni analizzati, mentre è assente *GATA5*. Le varianti a significato incerto identificate richiederanno ulteriori approfondimenti allo scopo di stabilire un loro possibile ruolo nella patogenesi BAV del probando. In particolare, il probando dovrà essere rivalutato clinicamente con esame obiettivo e controllo cardiologico e qualora possibile, sarà eseguita analisi di segregazione della variante nella famiglia.

Anche l'analisi con esoma non ha fornito informazioni di rilievo e difatti non sono state identificate varianti in comune tra le diverse famiglie. Inoltre, per ciascuna famiglia tutte le varianti geniche post-filtraggio sono state analizzate: in particolar modo è stato studiato nel dettaglio ciascun gene, facendo riferimento a qualsiasi informazione disponibile in letteratura che lo potesse rendere potenzialmente coinvolto nell'aortopatia BAV. Tuttavia, non è emerso alcun gene di tale interesse; ad ogni modo, i dati informatici ottenuti sono conservati nel database dell'Università di Antwerp dedicato a casistica aortopatia BAV così da poter riesaminare la coorte al raggiungimento di un campione considerevolmente più elevato di pazienti.

Per quanto riguarda la familiarità dell'aortopatia BAV, questa segrega nel 25% delle famiglie del presente studio (5 su 20), in accordo col 20% riportato in letteratura (Biner et al., 2009).

Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche della coorte del presente studio, un'accurata valutazione clinica non ha evidenziato alcun segno dismorfico distintivo né differenze fenotipiche tra probandi e familiare di primo grado. Questo potrebbe suggerire che il meccanismo genetico causativo agisca in maniera molto specifica durante la cardiogenesi, e che gli stessi trigger possano essere coinvolti nei processi patologici a carico della parete aortica dopo la nascita senza coinvolgere altri segmenti aortici o altri tessuti.

Come in altre forme non sindromiche di TAA con predisposizione genetica, la maggior parte dei pazienti non presenta ulteriori fattori di rischio cardiovascolari, come ipertensione, diabete mellito, sovrappeso, fumo e, ipercolesterolemia o altri. Analogamente, un terzo dei probandi di questo studio non ha alcun fattore di rischio cardiovascolare prima della diagnosi e un terzo presenta un solo fattore di rischio, suggerendo pertanto che tali comuni fattori di rischio cardiovascolari non abbiano un ruolo importante nella patogenesi BAV in questa categoria di pazienti, in confronto ai pazienti con valvola aortica tricuspide.

Nei pazienti di questo studio il trattamento chirurgico di correzione dell'aorta ascendente è stato eseguito a un'età precoce (media 47,2 anni) e ad un diametro dell'aorta ascendente relativamente piccolo (medio 49,7 mm), in linea con i report della letteratura scientifica per cui la dilatazione aortica si presenta ad un'età significativamente più giovane nei pazienti con BAV rispetto a quelli con valvola aortica tricuspide (media 49 anni versus 61-64 anni) (Davies et al., 2007). Inoltre il 25% di pazienti di questo studio non presenta disfunzione valvolare al momento della chirurgia.

Nella letteratura non sono state riportate correlazioni tra la morfologia BAV con o senza rafe e rischio di dilatazione aneurismatica, né tra la severità istologica della degenerazione aortica mediale e le dimensioni aortiche e rischio di dissezione dell'aneurisma. In questo studio i campioni biotipici aortici mostrano una variabilità significativa di degenerazione della media (da moderata a severa) nel 39% dei pazienti con diametri aortici relativamente piccoli; questo riscontro enfatizza che le alterazioni istologiche possono far parte della patologia e non essere semplicemente correlate a forze emodinamiche disfunzionali. Nonostante il

piccolo numero di pazienti, il dato patologico conferma le precedenti osservazioni in pazienti BAV che presentano frequentemente anomalie significative o avanzate della parete aortica ascendente indipendentemente dalla severità della disfunzione valvolare aortica (Leone et al., 2012). Purtroppo in questo studio le informazioni disponibili sull'esatta morfologia della BAV e sulla presenza/assenza del rafe sono limitate.

A causa dell'esiguo numero di pazienti nella presente coorte non è stato possibile valutare differenze nell'età alla chirurgia, nei diametri aortici, nel tasso di crescita aortico, nella presenza di necrosi cistica mediale, e nella disfunzione valvolare tra casi sporadici e familiari. Analogamente, la differenza nel rapporto maschi-femmine, di 19 a 1 nella presente coorte, in confronto al 3 a 1 riportato in letteratura, potrebbe essere un bias dovuto all'esiguo numero della nostra coorte.

Infine, l'ecocardiografia nei 77 familiari di primo grado dei 20 probandi ha identificato una nuova diagnosi di TAA con indicazione al trattamento chirurgico, ed ha confermato 8 precedenti diagnosi di BAV, TAA o entrambe (9 su 77=11,7%) sottolineando l'importanza e lo screening familiare in BAV.

In conclusione, l'esiguo numero di pazienti è un importante fattore limitante di questo studio; tuttavia, considerando l'alta frequenza di BAV nella popolazione e la disponibilità di diversi report della letteratura scientifica su famiglie con FTAA positive ad *ACTA2*, con solo pochi soggetti positivi alla mutazione che presentavano anche BAV, il risultato di questo studio pilota sembrerebbe giustificare la conclusione che *ACTA2* non contribuisce in maniera significativa alla patogenesi dell'aortopatia BAV.

Le conoscenze dei meccanismi genetici coinvolti nella patogenesi dell'aortopatia BAV rimangono ancora elusive. Sulla base dei risultati degli studi pubblicati finora non è emersa una base univoca, suggerendo che sia fattori multifattoriali che monogenici e/o poligenici dovrebbero essere presi in considerazione nella patogenesi dell'aortopatia BAV. Pertanto, sono necessari studi su coorti di pazienti molto grandi tale da raggiungere un potere statistico sufficiente per l'identificazione di varianti genetiche associate. Inoltre, analisi di ibridizzazione genomica comparativa (array-CGH) ed analisi NGS di sequenziamento esonico (WES) o genomico (WGS) da eseguire soprattutto, ma non solo, in grandi famiglie con aortopatia BAV, potrebbero rappresentare strumenti promettenti per identificare nuovi geni causativi o disregolazione

genomica. Va sottolineato comunque l'importanza di una raccolta completa e dettagliata dei dati clinici di tutti i pazienti arruolati e della loro storia familiare. Nel frattempo che non sono ancora disponibili marcatori biologici per scopi prognostici e terapeutici, dovrebbe essere raccomandata una chirurgia elettiva nei pazienti BAV, sebbene il rischio di dissezione aortica in tali pazienti è da stimare probabilmente basso in confronto ad altre condizioni genetiche spesso sindromiche. Inoltre, è molto importante raccomandare un'ecocardiografia a tutti i familiari di primo grado.

Sindrome di Loeys-Dietz

La Sindrome di Loeys-Dietz (LDS) è stata descritta per la prima volta nel 2005 come una patologia genetica del tessuto connettivo a trasmissione autosomica dominante, causata da mutazioni in eterozigosi a carico dei recettori 1 e 2 del transforming growth factor beta (*TGFBR1* e *TGFBR2*) e caratterizzata clinicamente dalla triade ipertelorismo, palatoschisi o ugola bifida, aneurismi arteriosi/aortici e/o tortuosità arteriosa (Loeys et al., 2005). Le 10 famiglie descritte presentano caratteristiche cliniche che si sovrappongono parzialmente a MFS, senza tuttavia raggiungerne i criteri diagnostici in alcun caso. La patologia aortica aneurismatica tende ad essere molto più aggressiva, con rottura in giovane età e a diametri non associati ad alto rischio in MFS, mentre il fenotipo craniofaciale di ipertelorismo, palatoschisi, ugola bifida, craniostenosi non è mai stato associato a MFS; quest'ultima caratteristica è d'altro canto tipica di una sindrome marfanoide nota come sindrome di Shprintzen Goldberg (SGS), a cui non si associano però la palatoschisi, la tortuosità arteriosa e il massivo coinvolgimento arterioso.

Nel 2006 Loeys e Dietz riportano in un nuovo lavoro (Loeys et al., 2006) la caratterizzazione clinica e molecolare di 30 nuovi casi di LDS con fenotipo aortico e craniofaciale, designando la categoria tipo 1 di LDS, e di 12 casi con fenotipo sovrapponibile alla sindrome di Ehlers-Danlos (EDS) vascolare, caratterizzati da un fenotipo aortico e cutaneo (facilità alle ecchimosi, cicatrici atrofiche, lassità legamentosa, pelle traslucida o vellutata), designando la categoria tipo 2 di LDS. Le due categorie sembrano rappresentare tuttavia un continuum clinico dove all'estremità lieve la presentazione clinica è simile a MFS o a TAAD familiare, mentre all'estremità severa c'è un fenotipo complesso con la triade clinica precedentemente riportata associata a dissezione aortica o rottura in età infantile. L'aggressività della patologia aortica è evidente: l'età di sopravvivenza media nella coorte di 52 pazienti e 38 familiari è di 37 anni, mentre l'età media di morte è di 26 anni (con range da 0,5 a 47), con principale causa di morte la dissezione dell'aorta toracica (67%), seguita da dissezione dell'aorta addominale (22%) ed emorragia cerebrale (7%). L'età media alla prima dissezione è di 26,7 anni (con range da 0,5 a 47), e l'età al primo intervento vascolare è di 19,8 anni, con una differenza significativa tra il tipo 1 e il tipo 2, individuando una

correlazione tra severità del fenotipo craniofaciale e precocità nel primo evento cardiovascolare. È stata riportata anche un'alta incidenza di complicanze legate alla gravidanza: in 6 donne su 12 si è verificata una dissezione aortica o una rottura uterina durante la gestazione o nell'immediato periodo post-partum. Il coinvolgimento arterioso è diffuso all'intero albero arterioso, con aneurismi e tortuosità soprattutto a carico delle arterie di testa e collo e dei rami addominali. Le mutazioni identificate sono 29 in *TGFBR2* e 13 in *TGFBFR1*; eccetto una mutazione di splicing ed una nonsense a carico di *TGFBR2*, tutte le altre sono missenso negli esoni codificanti per il dominio serina-treonina chinasi o nelle immediate vicinanze. Apparentemente non si rilevano differenze nella presentazione clinica tra mutazioni in *TGFBR2* e *TGFBFR1*, e tranne rare eccezioni vi è concordanza intrafamiliare. Nell'esperienza riportata si sottolinea come tutti gli individui con mutazioni nei *TGFBFR* presentino caratteristiche cliniche che consentano di discriminare LDS da MFS o TAAD familiare, sia pur per piccole osservazioni che potrebbero sfuggire se non specificatamente ricercate (es. ugola bifida e caratteristiche cutanee) o se non valutate con adeguato imaging (es. tortuosità arteriosa), suggerendo pertanto una rivalutazione delle famiglie descritte in letteratura con mutazioni in *TGFBR2* e fenotipo dichiarato MFS o TAAD (Mizuguchi et al., 2004; Pannu et al., 2005). Una corretta diagnosi è peraltro di estrema importanza in considerazione dell'aggressivo fenotipo vascolare di LDS, per cui si propone l'intervento chirurgico dell'aorta ascendente al raggiungimento del diametro massimo di 40 mm (a differenza di MFS dove la soglia raccomandata è di 50 mm).

Negli anni a seguire la letteratura medica ha annoverato una moltitudine di articoli riguardanti LDS: piccole casistiche, singoli case reports, esperienze chirurgiche, valutazioni di caratteristiche cliniche nuove in singoli pazienti o grandi coorti.

Di rilievo è il primo lavoro chirurgico (Williams et al., 2007) in cui, sulla base della propria casistica di 71 pazienti, Williams e colleghi propongono delle linee guida per il monitoraggio clinico-vascolare e per il timing chirurgico del paziente pediatrico e adulto con LDS.

Come valutazione iniziale in un paziente che ha ricevuto diagnosi di LDS, confermata molecularmente, si raccomanda eocardiogramma e TAC 3D per lo studio dei vasi cerebrali, toracici, addominali e pelvici, da ripetere rispettivamente

ogni 6 mesi e ogni anno o sulla base dei rilievi strumentali. La soglia per l'intervento chirurgico viene considerata in maniera differenziata nel bambino con caratteristiche craniofacciali severe o lievi e nell'adulto: per la radice aortica si considera sia una soglia massima oltre la quale intervenire (rispettivamente Z-score maggiore di 3, Z-score maggiore di 4, diametro maggiore di 40 mm) sia un veloce aumento del diametro (maggiore di 5 mm in un anno). Per i bambini si consiglia, se possibile, di ritardare l'intervento finché l'annulus aortico non raggiunga il diametro di 18 mm, consentendo così di impiantare una protesi di grandezza sufficiente da essere adeguata alla crescita del bambino. Per gli adulti vengono considerati i diametri massimi oltre i quali intervenire anche per gli aneurismi dell'aorta discendente e dell'aorta addominale (rispettivamente di 50 mm e 40 mm) oppure di nuovo si consiglia l'intervento se si osserva un rapido aumento nel diametro (maggiore di 5 mm in un anno). Per gli aneurismi a carico degli altri vasi non vengono forniti dei valori di riferimento per l'intervento chirurgico, che viene consigliato nei casi a rapida espansione. In conclusione, si raccomanda un intervento precoce e profilattico allo scopo di evitare eventi vascolari maggiori; i pazienti con LDS sembrano tollerare bene la chirurgia e hanno una buona tolleranza per la manipolazione intraoperatoria dell'aorta. Tale dato è di grande importanza poiché invece i pazienti con sindrome di Ehlers-Danlos vascolare presentano un tessuto vascolare molto friabile e hanno un'alta incidenza di eventi maggiori vascolari intraoperatori e nel precoce periodo post-operatorio.

I dati riportati da Williams vengono confermati anche in un lavoro successivo che si concentra nello specifico su pazienti con LDS in età pediatrica (Everitt et al., 2009) mostrando un buon esito a lungo termine in bimbi sottoposti ad intervento profilattico di sostituzione della radice aortica con risparmio della valvola nativa o ad intervento di riparazione della valvola mitralica. Il lavoro di Everitt riporta anche il riscontro, nella propria coorte, di benefici a lungo termine di una terapia postoperatoria con ACE-inibitori rispetto a beta-bloccanti; dato non sorprendente in considerazione del già noto effetto benefico del blocco dell'angiotensina II in pazienti con MFS (Yetman et al., 2007; Matt et al., 2008).

Ulteriori aspetti clinici caratterizzanti i pazienti con LDS sono stati messi in evidenza da una serie di lavori che riportano un'aumentata incidenza di

predisposizione allergica e problematiche intestinali, e di aumentato rischio di fratture e osteoporosi (Frischmeyer-Guerrero et al., 2013; Tan et al., 2013).

Nuovi tipi di LDS: LDS tipo 3 e LDS tipo 4

Nel 2011 e nel 2012 vengono descritti due nuovi tipi di LDS dovuti ad alterazioni a carico di geni che alterano il signalling del TGF-beta, rispettivamente *SMAD3* e *TGFB2* che vanno a designare LDS tipo 3 e LDS tipo 4.

Il lavoro di van de Laar del 2011 riporta una grande famiglia con 22 individui affetti da aneurismi arteriosi e/o anomalie scheletriche o cutanee, con fenotipo sovrapponibile a LDS (aneurismi e tortuosità a carico di tutto l'albero arterioso, ipertelorismo, palatoschisi, ugola bifida) eccetto che per il riscontro di osteoartrite (o osteocondrite dissecante) osservato in età giovanile in tutti i pazienti, tanto che inizialmente la patologia viene chiamata sindrome Aneurismi-Osteoartrite. Tramite studio di linkage viene selezionato *SMAD3* come gene candidato nella famiglia, e di fatto l'analisi mutazionale di tale gene evidenzia la presenza di una mutazione in eterozigosi che segrega con la malattia in famiglia in maniera autosomica dominante. La casistica viene ampliata in un lavoro successivo (van de Laar et al., 2012; Figura 2) in cui vengono individuate 5 nuove famiglie con 5 mutazioni novel: l'osteoartrite è presente nel 96% dei soggetti, la degenerazione dei dischi intervertebrali nel 92%, l'osteocondrite dissecante nel 56% e dolori articolari nell'85%; per il resto il coinvolgimento vascolare appare aggressivo come nella LDS con rotture a diametri ridotti. Le mutazioni descritte a carico di *SMAD3* sono loss-of-function come nella LDS, con segnale del TGF-beta non propagato, ma di fatto gli studi in vivo su parete arteriosa mostrano un aumento paradossale del signalling del TGF-beta.

Nel 2012 due lavori indipendenti, del gruppo belga-statunitense di Loeys e Dietz e del gruppo franco-statunitense di Boileau e Milewicz, riportano mutazioni di *TGFB2* come causative di una forma sindromica di TAAD familiare.

Il lavoro di Loeys (Lindsay et al., 2012) individua in 2 pazienti con aneurisma aortico, tortuosità arteriosa, deformità del petto, aracnodattilia, scoliosi, strie, ipertelorismo, valvola aortica bicuspidale, piede torto e lieve deficit cognitivo, una microdelezione in 1q41 tramite analisi microarray. La delezione comprende in entrambi i pazienti il gene *TGFB2*, ritenuto un buon candidato per la patogenesi del loro quadro clinico. L'analisi di tale gene in una coorte di 86 pazienti con

TAAD negativi a *FBNI* e *TGFBR1/2* riscontra 6 mutazioni in eterozigosi, nello specifico 3 mutazioni missenso, una nonsense e due delezioni intrageniche, per cui viene proposta l'aploinsufficienza come meccanismo patogenetico alla base. Anche in questo caso l'effetto paradossale del signalling del TGF-beta è dimostrato tramite studi di immunohistochimica su tessuto aortico di pazienti in cui risulta aumentata l'attivazione nucleare degli effettori del TGF-beta (SMAD2 e SMAD3) e l'espressione di collegene e fattore di crescita del tessuto connettivo, i cui geni sono regolati dal TGF-beta.

Il lavoro di Boileau arriva alle medesime conclusioni individuando le mutazioni causative in *TGFB2* tramite genome-wide linkage analysis in 2 grandi famiglie con TAAD; l'analisi successiva del gene in 276 probandi con TAAD identifica 2 ulteriori mutazioni predette causare aploinsufficienza. La caratterizzazione clinica degli individui affetti vede un'età media di presentazione di patologia aortica di 35 anni, con prevalente coinvolgimento della radice aortica; viene riportata tortuosità cerebrovascolare, prolasso mitralico, iperlassità legamentosa e strie cutanee.

Diagnosi di LDS, diagnosi differenziale e gestione clinica

La diagnosi di LDS è basata sul riscontro delle caratteristiche cliniche tipiche e sulla conferma molecolare; ad oggi non sono stati elaborati dei criteri diagnostici minimi. Nel 2010, in un articolo di aggiornamento per gli operatori clinici (Van Hemelrijk et al., 2010), Loeys proponeva delle categorie da prendere in considerazione per la diagnosi e per un appropriato test molecolare:

1. Pazienti con la caratteristica triade LDS: ipertelorismo, palatoschisi/ugola bifida e aneurismi aortici/arteriosi/tortuosità.
2. Pazienti con aneurismi aortici/arteriosi (soprattutto esordio precoce dell'aneurisma aortico e storia di morte in età giovane) con una combinazione variabile di ulteriori caratteristiche: aracnodattilia, camptodattilia, piede torto, craniostenosi (di tutti i tipi), sclere blu, pelle sottile con cicatrici atrofiche, facilità alle ecchimosi, ipermobilità articolare, valvola aortica bicuspidale (BAV), patent ductus arteriosus (PDA), difetti settali atriali (ASD) e difetti settali ventricolari (VSD).
3. Pazienti con fenotipo simile a sindrome di Ehler-Danlos vascolare con normale biochimica per il collagene III, ma tipiche caratteristiche

cutanee (pelle sottile, cicatrici atrofiche, facilità alle ecchimosi) e ipermobilità articolare.

4. Pazienti con fenotipo simile a MFS, soprattutto nei casi senza ectopia lentis, ma con caratteristiche aortiche e scheletriche che non soddisfano i criteri di Ghent per MFS (aracnodattilia, deformità del petto e scoliosi) e/o con screening di *FBNI* negativo.

5. Famiglie con TAAD autosomico dominante, soprattutto nei casi di dissezioni aortiche/arteriose precoci, patologia aortica oltre la radice aortica (includendo le arterie cerebrali), tortuosità aortica/arteriosa, in associazione con ASD/VSD/PDA; lievi caratteristiche scheletriche marfanoidi possono essere presenti.

Un articolo del gruppo di Loeys and Dietz (MacCarrick et al., 2014) sottolinea nuovamente come non esistano specifici criteri clinici diagnostici, e che la diagnosi è confermata dal test molecolare. Alla luce della scoperta dei due nuovi geni, *SMAD3* e *TGFB2*, causativi di fenotipo sovrapponibile a LDS, viene proposto che qualsiasi mutazione a carico di uno dei quattro geni (*TGFBRI*, *TGBR2*, *SMAD3* e *TGFB2*) in combinazione con aneurismi, o dissezioni arteriose, o storia familiare di LDS documentata, debba essere sufficiente a stabilire la diagnosi; tale procedura diagnostica potrebbe essere applicata in futuro ad ogni nuovo gene scoperto che influenzi direttamente la cascata del segnale del TGF-beta e risulti in una patologia vascolare diffusa e/o aggressiva.

Questa proposta è motivata dalla volontà di sensibilizzare i clinici che hanno in carico tali pazienti alla necessità di consulenze e gestioni specializzate, e considera l'allargamento dello spettro clinico di LDS evidence-based per includere anche pazienti con caratteristiche dismorfiche minime o assenti.

La diagnosi differenziale di LDS viene fatta con:

- MFS, causata da mutazioni di *FBNI* e caratterizzata sul piano clinico da manifestazioni scheletriche (dolicocefalia, dolico stenomelia, aracnodattilia, piede piatto, scoliosi, deformità del petto), oculari (miopia, ectopia lentis), cardiovascolari (prolasso mitralico, dilatazione della radice aortica), cutanee (strie), polmonari (pneumotorace) e da ectasia durale; in particolare l'ectopia lentis, presente nel 60% dei pazienti con MFS, non è associata a LDS. I criteri clinici per la diagnosi di MFS sono stati rivisti nel 2010 (Loeys et al., 2010) nei "Revised Ghent Criteria".

- EDS vascolare, causata da mutazioni di *COL3A1*, per cui vi è una sovrapposizione del fenotipo cutaneo (facilità alle ecchimosi, cicatrici atrofiche, lassità legamentosa, pelle traslucida o vellutata), che aveva portato alla classificazione del tipo 2 di LDS.
- SGS, causata da mutazioni di *SKI* (Doyle et al., 2012), con cui condivide caratteristiche craniofaciali e scheletriche, mentre la tortuosità arteriosa, la palatoschisi/ugola bifida e le manifestazioni cutanee sono rare o assenti in SGS.
- Aracnodattilia Contrattuale Congenita (CCA), causata da mutazioni di *FBN2* e caratterizzata da aspetto marfanoide, contratture e aracnodattilia.
- Sindrome delle arterie tortuose, causata da mutazioni in *SLC2A10*, caratterizzata da tortuosità arteriosa, aneurismi arteriosa, stenosi dell'arteria polmonare, ipertelorismo, aracnodattilia.
- FTAAD, in cui generalmente le manifestazioni cardiovascolari costituiscono l'unica caratteristica; diversi loci sono stati mappati in famiglie con TAAD, e in alcune famiglie i geni *ACTA2*, *MYLK*, *MYH11*, sono stati identificati come geni causativi, sebbene generalmente in presenza di caratteristiche addizionali. (Van Hemelrijk et al., 2010; GeneReviews LDS, 2013).

L'articolo precedentemente citato (MacCarrick et al., 2014) riporta le prime linee guida stilate per una completa sorveglianza medica e per il trattamento delle quattro forme di LDS, che sebbene possano presentare variabilità clinica, richiedono una simile gestione.

Per quanto riguarda la gestione cardiovascolare clinica e chirurgica, si raccomanda ecocardiogramma annuale (o più frequente in base alla severità della patologia aortica), angioRM o angio-TC dalla testa alla pelvi biennale, terapia con ACE-inibitori o beta-bloccanti o bloccanti del recettore dell'angiotensina, controllo della pressione arteriosa, restrizioni fisiche (evitare sport competitivi e di contatto, sollevamento pesi), evitare farmaci come decongestionanti e vasocostrittori che possono avere un impatto negativo sul sistema cardiovascolare, profilassi dell'endocardite. Per quanto riguarda le soglie per l'intervento chirurgico, queste sono rimaste sostanzialmente le stesse proposte da Williams nel 2007 (Williams et al., 2007); la differenza riguarda la gestione nei bambini in cui

si consiglia di rimandare l'intervento fino ad un diametro dell'annulus di 20-22 mm (anziché 18 mm) e vengono considerati non più come soglia i valori degli Z-score, ma i diametri in mm (massimo 40 mm nei bimbi con manifestazioni craniofacciali lievi). Si raccomanda inoltre di prestare attenzione alla tortuosità arteriosa e alle arterie multiple e aberranti che possono essere di impatto sull'intervento chirurgico, e si consigliano interventi "aperti" rispetto a procedure endovascolari.

Per quanto riguarda le raccomandazioni di ordine ortopedico: in primis è consigliata la valutazione di un'eventuale instabilità del rachide cervicale tramite RX in flessione ed estensione (nei bambini da ripetere ogni 3-5 anni in base alle crescita); le altre manifestazioni, quali piede torto, contratture, scoliosi, vanno trattate secondo i protocolli standard. La spondilolistesi tende a progredire con una frequenza maggiore rispetto alla popolazione generale, per cui va monitorata almeno una volta all'anno fino al raggiungimento della maturità scheletrica. L'osteoartrite è stata riportata principalmente nella LDS tipo 3, e non è nota la sua presenza nelle altre forme, ad ogni modo viene consigliato un trattamento sintomatico. Infine, i pazienti devono essere informati sul possibile rischio aumentato di fratture e diminuita densità minerale ossea, e quindi sulle conseguenti osteopenia e osteoporosi nella popolazione più matura; tuttavia, al momento l'esito di un trattamento con bifosfonati nei pazienti con LDS non è noto.

Altre raccomandazioni riguardanti altri organi e apparati consigliano trattamenti secondo protocolli standard in base alla patologia; si raccomanda una consulenza con uno specialista neurologo in caso di emicrania, in cui il trattamento può essere complesso in considerazione delle controindicazioni a farmaci vasocostrittori; si consiglia il trattamento delle ernie secondo protocolli standard con la consapevolezza del tessuto cicatriziale potenzialmente anomalo; si suggerisce una valutazione oftalmologica per miopia o patologie dei muscoli oculari; si propone un consulto pneumologico in caso di apnea notturna. Infine, si raccomanda una consulenza presso lo specialista genetista clinico per la discussione sulla gestione completa della patologia, le modalità di trasmissione, i rischi di ricorrenza, le possibilità di diagnosi prenatale e l'allargamento del test nei familiari a rischio; nel caso fosse necessario un supporto psicologico, questo dovrebbe essere offerto.

Infine, le ultime raccomandazioni riguardano la gravidanza in donne affette da LDS. Il primo articolo di Loeys, infatti, evidenziava una probabilità molto alta di complicanze legate alla gravidanza (eventi maggiori in 6 donne su 12 in 21 gestazioni, Loeys et al., 2006), mentre successivi articoli non hanno riportato un così alto tasso di complicanze: un caso di dissezione aortica su 31 donne in un totale di 93 gestazioni, (Tran-Fadulu et al., 2009) e un caso di emorragia post-partum in 13 donne in un totale di 23 gravidanze (van de Laar et al., 2012). Sembra che le donne affette da LDS possano tollerare bene la gravidanza e il parto, che tuttavia andrebbero comunque considerati ad alto rischio, per cui un monitoraggio ecocardiografico in ogni trimestre e nel periodo post-partum sarebbe raccomandato, così come la presa in carico presso un centro ostetrico di terzo livello per il parto. Non esistono studi comparativi tra parti cesarei e vaginali, tuttavia si ritiene che l'evitare un'alta pressione intra-addominale con un parto cesareo precoce possa ridurre il rischio di complicanze ostetriche. Inoltre, si raccomanda l'uso di beta-bloccanti durante la gravidanza, con interruzione degli eventuali ACE-inibitori prima della gestazione, e una valutazione di eventuale ectasia durale e/o deformità spinali che possano avere un impatto sull'anestesia epidurale. Chiaramente prima di intraprendere una gravidanza è consigliata una consulenza genetica preconcezionale e un imaging vascolare completo.

Nuovi geni: TGFBR3 e SMAD2

Nel 2015, vengono aggiunti due nuovi geni alla lista dei geni causativi di sindrome di Loeys-Dietz. Si tratta dei geni *TGFBR3* e *SMAD2*, anch'essi appartenenti al pathway del signalling del TGF β . Bertolli-Avena et al., descrivono 43 pazienti di 11 famiglie con una presentazione sindromica di TAA e mutazioni nel gene *TGFBR3*. Le caratteristiche cliniche si sovrappongono con LDS, SGS e MFS, ed includono palatoschisi, ugola bifida, iperaccrescimento scheletrico, instabilità cervicale, piede torto. In linea con le precedenti osservazioni relative alla parete aortica di pazienti con mutazioni negli effettori del signalling TGF β , anche in questo caso viene confermata una up-regolazione di entrambe le vie canonica e non canonica del TGF β , in associazione con una up-regolazione dell'espressione dei ligandi del TGF β (Bertoli-Avella et al., 2015).

Micha et al., descrivono 3 famiglie con mutazioni nel gene *SMAD2* e con patologia cardiovascolare caratterizzata da aneurismi arteriosi e dissezione, in un contesto clinico molto variabile, da sindromico con sovrapposizione con MFS ad apparentemente isolato. (Micha et al., 2015).

Razionale e scopo dello studio

Ogni nuova patologia genetica richiede una certa quantità di tempo prima di poter raggiungere una piena definizione diagnostica, ancor più tempo è necessario per l'elaborazione di raccomandazioni cliniche e indicazioni terapeutiche che la interessino, e del tempo ancora maggiore può essere richiesto, in alcuni casi, per svelarne completamente la patogenesi. Chiaramente tale tempistica è strettamente correlata a quanto la malattia è "rara", alla progressiva "dimestichezza" dei clinici nel riconoscerla e al diffondersi a livello internazionale di centri specialistici di riferimento, nonché di centri di ricerca molecolari.

Nel caso della sindrome di Loeys-Dietz, la storia è cominciata 12 anni fa, e i primi anni sono stati necessari per raggiungere una sua identità con l'accorpamento di quadri fenotipici considerati altrimenti separati, a metà strada hanno fatto il loro ingresso nuovi protagonisti molecolari, e a distanza di un decennio è stato fatto un tentativo unificatore di supporto alla diagnosi e al management.

Durante questo percorso, data la relativa frequenza della malattia, unitamente alle caratteristiche cardiovascolari che la rendono non difficilmente individuabile alla diagnosi dei clinici, la letteratura medica ha visto un proliferare di singoli case report o di casistiche più grandi, aggiungendo di volta in volta dettagli nuovi, o confermando quanto già noto. In virtù della frequenza della patologia aneurismatica aortica nella popolazione generale (circa 1,4 su 10000 persone all'anno), responsabile dell'1-2% di tutti decessi nei paesi Occidentali, è legittimo interrogarsi sulla adeguatezza ad eseguire il test nei casi di TAAD familiare, ma soprattutto è fondamentale saperne interpretare opportunamente l'esito e gestirne il significato all'interno della famiglia. Allo stesso modo, questo processo assume rilevanza nel contesto familiare di un caso di bambino sindromico sporadico, dove il risultato del test genetico può aiutare a indirizzare i genitori al percorso clinico più appropriato.

Per tale motivo, a tal punto della storia di LDS, si è ritenuto doveroso e di estrema importanza mettere assieme l'esperienza di tre centri Specialistici, che sono i due centri che hanno dato i natali alla sindrome, cioè l'Istituto McKusick-Nathans di Medicina Genetica dell'Università Johns Hopkins di Baltimora (USA) dove lavora il Prof. Dietz e dove ha lavorato per un periodo il Prof. Loeys, e il Centro di Genetica Medica dell'Università di Anversa (Belgio) dove lavora attualmente il Prof. Loeys, insieme all'Unità Operativa di Genetica Medica del Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna in collaborazione col Centro Marfan della Regione Emilia-Romagna, unitamente alla casistica descritta nella letteratura scientifica, per raccogliere in un database dedicato e fruibile dalla comunità scientifica le caratteristiche cliniche dei pazienti con LDS e le relative mutazioni allo scopo rilevare eventuali correlazioni genotipo-fenotipo o altre correlazioni utili ad un counselling e management clinico.

Materiali e Metodi

a) Creazione del database

Allo scopo di raccogliere una grande casistica di pazienti con LDS comprendente sia dati clinici che molecolari si è scelto di usare il database Leiden Open Variation Database (LOVD) (Fokkema et al., 2011) in virtù delle sue caratteristiche di visibilità ed accesso libero sul web, versatilità e capacità di personalizzazione del database, collegamenti ai maggiori database web internazionali inerenti la genetica.

Il LOVD del presente studio è stato intitolato "Loeys-Dietz Syndrome Mutation Database" ed è ospitato dal server <http://143.169.238.105/LOVD/> dell'Università di Antwerp. Il database è stato creato seguendo il protocollo dello sviluppatore (Fokkema et al., 2011) ed è stato personalizzato aggiungendo informazioni cliniche (<http://143.169.238.105/LOVD/columns/Phenotype>) discusse insieme al Prof. Loeys e al Prof. Dietz sulla base di quanto riportato nei primi articoli su LDS, negli articoli successivi, e in base alla loro esperienza personale.

b) Raccolta della casistica della letteratura

Sono stati cercati in Pubmed tutti gli articoli pubblicati su LDS dal 2004 al 2017 (01 Settembre 2017), immettendo come parametri nel campo di ricerca il

nome della sindrome o uno dei geni causativi insieme alla parola aneurisma: (loeys-dietz syndrome) OR (TGFB3* and aneurysm) OR ("TGF-beta receptor" and aneurysm) OR (SMAD3 and aneurysm) OR ("aneurysms-osteoarthritis syndrome") OR (TGFB2 and aneurysm) OR (SMAD2 and aneurysm) OR (TGFB3 and aneurysm). Questo per selezionare gli articoli riguardanti la patologia e il ruolo dei vari geni ad essa correlati, e non esclusivamente la funzione del gene o meccanismi molecolari. Successivamente, allo scopo di ottenere una correlazione fenotipo-genotipo per il caso o la casistica descritti, i criteri che hanno guidato la selezione della casistica della letteratura sono stati essenzialmente due: la disponibilità del fenotipo del paziente (o della famiglia), seppur non ben caratterizzato, e la presenza della mutazione identificata come causativa. Gli articoli che non hanno soddisfatto uno di questi criteri non sono stati selezionati. In effetti, diversi articoli descrittivi clinici, principalmente di ambito vascolare e cardiocirurgico, pur riportando un dettagliato fenotipo non riportavano la mutazione identificata nel caso, e pertanto non sono stati selezionati.

Ciascun articolo selezionato è stato valutato per tutte le caratteristiche richieste dal database opportunamente inserite.

c) Raccolta della casistica dei tre centri Internazionali

Per quanto riguarda il centro di Bologna, i pazienti inclusi nello studio sono tutti i pazienti diagnosticati con LDS nell'ambito del Centro Marfan della Regione Emilia-Romagna. I pazienti hanno ricevuto una consulenza genetica pre e post test presso l'Ambulatorio di Genetica Medica del Policlinico S.Orsola-Malpighi o dell'Arcispedale S. Maria Nuova di Reggio Emilia, includente la ricostruzione della storia familiare con albero genealogico, l'anamnesi personale e degli eventuali familiari affetti, l'esame obiettivo con ricerca specifica dei segni di LDS; in seguito all'esito del test genetico i pazienti hanno ricevuto una consulenza post-test. Tutti i pazienti sono presi in carico presso il Centro Marfan con follow-up specifico e personalizzato. I centri di Anversa e Baltimora hanno fornito una propria casistica di pazienti diagnosticati e seguiti presso i rispettivi centri.

Tutti i casi sono stati inseriti nel database completando le informazioni molecolari e cliniche.

Risultati

Il database LOVD raccoglie in data 01/10/2017 595 casi totali.

La tabella 3 riporta il numero di casi e di varianti uniche inserite per ciascun gene. Si rileva che il gene *TGFBR2* è il più frequentemente mutato (247 casi) a cui segue *TGFBR1* (133 casi), *SMAD3* (87 casi), *TGFB2* (68 casi), *TGFB3* (51 casi) e *SMAD2* (9 casi).

Le tabelle 4, 5, 6, 7, 8, 9 riportano le varianti note per ciascun gene.

Si osserva che per il gene *TGFBR1* le mutazioni descritte sono principalmente sostituzioni (97%), mentre in bassa percentuale (3%) sono riportate delezioni; a livello proteico si tratta nella maggiorparte dei casi di mutazioni missenso. Come hotspot mutazionale risulta frequentemente mutato il residuo 241 (cambio aminoacidico di serina in leucina) nell'esone 4, e soprattutto il residuo 487 (cambio di arginina in triptofano o glutammina) nell'esone 9.

Per il gene *TGFBR2* sono descritte principalmente sostituzioni (95%), mentre le delezioni rappresentano un 7%. Le mutazioni a livello proteico sono nella maggior parte dei casi missenso (85%), nel 6% sono nonsense, le restanti sono delezioni in frame e frameshift. I residui aminoacidici più frequentemente coinvolti da mutazioni sono: nell'esone 5 il 446 (cambio di aspartato in asparagina o istidina o tirosina) e il 460 (cambio di arginina in cisteina o leucina o istidina in); nell'esone 7 il 528 (cambio di arginina in cisteina o glicina o istidina o serina) e il 537 (cambio di arginina in cisteina o glicina o prolina).

Nel caso del gene *SMAD3* le sostituzioni sono riportate nel 79% dei casi, delezioni nel 10% ed inserzioni nel 7%. A livello proteico le mutazioni missenso sono rappresentate per il 60% dei casi, le nonsense nell'11% dei casi, mentre le frameshift nel 23% dei casi. Nell'esone 6 il residuo aminoacidico 782 è riportato in più casi, così come il residuo 1102 a carico dell'esone 8.

I casi descritti con coinvolgimento del gene *TGFB2* riportano sostituzioni nel 65% dei casi, delezioni nel 19% ed inserzioni nel 12% dei casi. A livello proteico si rilevano mutazioni missenso nel 42% dei casi, nonsense nel 23%, frameshift nel 23% e delezioni in frame nel 6% dei casi. I residui aminoacidici più frequentemente coinvolti sono nell'esone 3 (577), nell'esone 6 (980) e 7 (1097).

Per il gene *TGFB3* sono descritte sostituzioni nell'81% dei casi, mentre nei rimanenti casi si tratta di delezioni; a livello proteico le mutazioni sono missenso

nel 55% dei casi, nonsense nel 13%, frameshift nel 19% e mutazioni in frame nel 13%.

A carico del gene *SMAD2* sono stati descritte 9 mutazioni di sostituzioni missenso.

Le tabelle 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 riportano le caratteristiche cliniche note in totale e per ciascun gene. Viene riportato il numero assoluto di casi in cui la caratteristica clinica è presente o assente e la sua frequenza (%yes); viene inoltre riportato il numero assoluto di casi in cui non è disponibile il dato sulla presenza o assenza della caratteristica clinica in oggetto e la sua percentuale (%NA). Si nota infatti come quest'ultimo valore percentuale sia mediamente alto e contributivo dell'impossibilità a poter eseguire una valutazione completa dei dati raccolti.

Per quanto riguarda l'ereditarietà si evidenzia che circa la metà dei casi e quasi i due terzi siano familiari relativamente ai geni *TGFBR2* e *TGFBR1*; per gli altri geni sono pochi i dati a disposizione.

Per quanto riguarda le caratteristiche cardiovascolari si rileva la presenza di dilatazione della radice aortica nella maggioranza dei pazienti (tra il 66 e l'86%), tranne che per il gene *TGFB3* dove la dilatazione è presente nel 35,7% dei casi; mentre una dilatazione dell'aorta ascendente è presente nel 15-57,8% dei pazienti. L'intervento chirurgico aortico si è reso necessario in circa la metà dei pazienti (49,5-56,8%), tranne che per i casi legati a mutazioni nei geni *TGFB3* e *TGFB2* dove rispettivamente si è reso necessario in un quinto e poco più di un quarto dei pazienti. Altri aneurismi arteriosi si manifestano tra il 18-59,8% dei casi. Le dissezioni aneurismatiche aortiche si presentano tra il 23,6% e il 47,8%, ad eccezione dei casi legati a mutazioni nel gene *SMAD2* per cui non si hanno dati a disposizione; le dissezioni arteriose presentano maggiore variabilità presentando una frequenza tra il 6,7 e l'80%. La tortuosità dei vasi varia tra il 10,7 e il 37,7% per l'aorta e il 12,5 e il 73% per le arterie di medio e piccolo calibro. Tra le altre manifestazioni cardiovascolari si evidenzia la presenza di prolasso mitralico tra un quinto e un mezzo dei pazienti e la presenza di PDA nel 37,6% dei casi con mutazioni in *TGFBR2*.

Per quanto riguarda le caratteristiche craniofaciali si rileva che i due segni dell'originaria triade clinica, ipertelorismo e palatoschisi/ugola bifida, sono presenti rispettivamente tra il 16,7 e 70,3% dei casi e il 14,3 e 69,2% dei casi. Dal

punto di vista oculare l'ectopia lentis non è mai stata riportata, mentre miopia è presente tra il 13,3 e il 66,7% dei casi.

Per quanto concerne le caratteristiche scheletriche si evidenzia un habitus marfanoide in un caso su 5/ un caso su 2, con scoliosi tra il 41,3 e il 69% dei casi, deformità del torace tra il 37,5 e il 74,5% dei casi, aracnodattilia tra un terzo e due terzi dei casi, e piede piatto in più della metà dei casi. Dal punto di vista articolare è riportata un'iperlassità tra il 50 e l'80,8% dei casi, con lussazioni tra il 13,8 e il 41,2% dei casi, ad eccezione dei casi dovuti a mutazioni in *SMAD2* per cui non ci sono dati a disposizione. Spondilolistesi si osserva tra il 7 e il 57,9% dei casi, tranne che per i casi dovuti a mutazioni in *SMAD2*. Piede torto viene riportato tra l'8,7 e il 49,3% dei casi. Osteoartrite viene osservata tra il 17,6 e il 60% dei casi. Tra le altre caratteristiche scheletriche, in particolare nei casi dovuti a mutazioni in *TGFBR2* si evidenzia instabilità cervicale nella metà dei casi, camptodattilia nel 42,5% dei casi, contratture articolari nel 20,6% dei casi.

Per quanto riguarda le caratteristiche cutanee si osserva pelle sottile e traslucida tra un quinto e due terzi dei casi, ad eccezione dei casi dovuti a mutazioni in *SMAD2*, con cicatrici atrofiche e facilità alle ecchimosi rispettivamente tra il 14,3 e il 26% e tra il 37,5 e il 50% dei casi. Strie cutanee sono presenti tra il 20,6 e il 42,9% dei casi.

Infine, si osservano ernie in circa la metà dei pazienti ed ectasia durale tra un terzo e due terzi dei pazienti.

Tabella 3. Varianti totali e varianti uniche per ciascun gene

Symbol	Gene	Chr	Band	Transcripts	Variants	Unique variants
SMAD2	SMAD family member 2	18	q21.1	1	9	7
SMAD3	SMAD family member 3	15	q21-q22	4	87	61
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	1	q41	2	68	26
TGFB3	transforming growth factor, beta 3	14	q24	1	51	16
TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor 1	9	q22	1	133	77
TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	3	p22	2	247	119

Tabella 4. Varianti del gene *TGFBR1*

Exon	DNA change (cDNA)	Protein	Exon	DNA change (cDNA)	Protein
9	c.1433A>G	p.(Asn478Ser)	5	c.944A>G	p.(His315Arg)
3	c.521G>T	p.(Gly174Val)	6	c.998A>G	p.(Asp333Gly)
4	c.598A>C	p.(Thr200Pro)	6	c.1003A>C	p.(Lys335Gln)
4	c.598A>C	p.(Thr200Pro)	6	c.1003A>C	p.(Lys335Gln)
4	c.605C>T	p.(Ala202Val)	6	c.1003A>C	p.(Lys335Gln)
4	c.605C>T	p.(Ala202Val)	6	c.1003A>C	p.(Lys335Gln)
4	c.605C>T	p.(Ala202Val)	6	c.1013A>G	p.(Asn338Ser)
4	c.605C>T	p.(Ala202Val)	6	c.1051G>C	p.(Asp351His)
4	c.605C>T	p.(Ala202Val)	6	c.1051G>T	p.(Asp351Tyr)
4	c.649G>A	p.(Gly217Arg)	6	c.1052A>G	p.(Asp351Gly)
4	c.650G>T	p.(Gly217Val)	6	c.1058G>T	p.(Gly353Val)
4	c.652G>A	p.(Glu218Lys)	6	c.1058G>T	p.(Gly353Val)
4	c.670T>G	p.(Trp224Gly)	6	c.1061T>C	p.(Leu354Pro)
4	c.676G>A	p.(Gly226Arg)	6	c.1121G>A	p.(Gly374Glu)
4	c.682_684delGAA	p.(Glu228del)	7	c.1124C>T	p.(Thr375Ile)
4	c.682_684delGAA	p.(Glu228del)	6	c.1135A>G	p.(Met379Val)
4	c.682_684delGAA	p.(Glu228del)	9	c.1433A>G	p.(Asn478Ser)
4	c.683_685delAAG	p.(Glu228del)	9	c.1433A>G	p.(Asn478Ser)
4	c.685G>C	p.(Val229Leu)	9	c.1433A>G	p.(Asn478Ser)
4	c.689C>A	p.(Ala230Asp)	9	c.1433A>G	p.(Asn478Ser)
4	c.700T>C	p.(Phe234Leu)	9	c.1457T>C	p.(Leu486Ser)
4	c.702C>G	p.(Phe234Leu)	9	c.1457T>G	p.(Leu486Trp)
4	c.702C>G	p.(Phe234Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.702C>G	p.(Phe234Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.702C>G	p.(Phe234Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.702C>G	p.(Phe234Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.722C>T	p.(Ser241Leu)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.734A>G	p.(Glu245Gly)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.759G>A	p.(Met253Ile)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.759G>A	p.(Met253Ile)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.759G>A	p.(Met253Ile)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.759G>A	p.(Met253Ile)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.759G>A	p.(Met253Ile)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.759G>A	p.(Met253Ile)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.759G>A	p.(Met253Ile)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.759G>A	p.(Met253Ile)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.781G>A	p.(Gly261Arg)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.789A>G	p.(Ile263Met)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.796G>T	p.(Asp266Tyr)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.797A>G	p.(Asp266Gly)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.799A>C	p.(Asn267His)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.821C>G	p.(Thr274Ser)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
4	c.821C>G	p.(Thr274Ser)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
5	c.844T>C	p.(Tyr282His)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)
5	c.844T>C	p.(Tyr282His)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.844T>C	p.(Tyr282His)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.848A>C	p.(His283Pro)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1460G>A	p.(Arg487Gln)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1465A>G	p.(Lys489Glu)
5	c.934G>A	p.(Gly312Ser)	9	c.1459C>T	p.(Arg487Trp)

Tabella 6. Varianti del gene *SMAD3*

Exon	DNA change (cDNA)	Protein
0	del15q22.33	p.xxxx
0	del15q22.3q23	p.xxxx
3	c.401-6G>A	p.Val134Asp*fs33
3	c.401-6G>A	p.Val134Asp*fs33
1	c.2T>C	p.Met1Thr
1	c.3G>A	p.Met1Ile
1	c.5C>T	p.(Ser2Leu)
1	c.5C>T	p.(Ser2Leu)
1	c.147_155delCGAGCTGGA	p.(Asp49_Leu51del)
2	c.221G>A	p.(Arg74Gln)
2	c.221G>A	p.(Arg74Gln)
2	c.266G>A	p.(Cys89Tyr)
2	c.269G>A	p.(Arg90His)
2	c.281G>T	p.(Trp94Leu)
2	c.290T>G	p.(Leu97Arg)
2	c.300_301insAGGGCCGGCAGGC	p.(His101Argfs*14)
2	c.313delG	p.(Ala105Profs*11)
2	c.369dupT	p.(Pro124Serfs*42)
2	c.370C>A	p.(Pro124Thr)
2	c.374A>G	p.(Tyr125Cys)
2	c.374A>C	p.(Tyr125Ser)
3	c.401_405dup	p.(Pro136Phefs*52)
3	c.401-6G>A	p.(=)
3	c.455delC	p.(Pro152Hisfs*34)
3	c.511G>T	p.(Glu171*)
3	c.532+1G>C	p.?
4	c.539dup	p.(Pro181Thrfs*7)
4	c.546delT	p.(Gly183Alafs*3)
4	c.584_585insTC	p.(Gln195Hisfs*3)
6	c.715G>A	p.(Glu239Lys)
6	c.728G>C	p.(Arg243Pro)
6	c.741-742delAT	p.Thr247Profs*61
6	c.741-742delAT	p.Thr247fs*61
6	c.748G>A	p.(Ala250Thr)
6	c.762delC	p.(Met255*)
6	c.772G>C	p.(Asp258His)
6	c.772G>C	p.(Asp258His)
6	c.772G>C	p.(Asp258His)
6	c.782C>T	p.(Thr261Ile)
6	c.782C>T	p.(Thr261Ile)
6	c.782C>T	p.(Thr261Ile)
6	c.782C>T	p.(Thr261Ile)
6	c.788C>T	p.(Pro263Leu)
6	c.797C>A	p.(Ser266*)
6	c.803G>T	p.(Arg268Leu)
6	c.859C>T	p.(Arg287Trp)
6	c.859C>T	p.(Arg287Trp)
6	c.859C>T	p.(Arg287Trp)
6	c.860G>A	p.(Arg287Gln)
6	c.861delG	p.(Arg288Aspfs*53)
6	c.861delG	p.Arg288Aspfs*53
6	c.868A>T	p.(Ile290Phe)
6	c.868A>T	p.(Ile290Phe)
7	c.887T>C	p.(Leu296Pro)
7	c.977G>A	p.(Trp326*)
7	c.1009+1G>A	p.?
7	c.1009+1G>A	p.?
7	c.1009+2T>A	p.?
8	c.1045G>C	p.(Ala349Pro)
8	c.1080dupT	p.(Glu361*)
8	c.1080dupT	p.(Glu361*)
8	c.1091A>G	p.(Tyr364Cys)
8	c.1102C>T	p.(Arg368*)
8	c.1102C>T	p.(Arg368*)
8	c.1102C>T	p.(Arg368*)
8	c.1102C>T	p.(Arg368*)
8	c.1102C>T	p.(Arg368*)
8	c.1102C>T	p.Arg368*
8	c.1141G>C	p.(Gly381Arg)
8	c.1141G>C	p.(Gly381Arg)
9	c.1155-2A>G	p.?
9	c.1170_1179del	p.(Ser391Alafs*7)
9	c.1170_1179del	p.(Ser391Alafs*7)
9	c.1170_1179del	p.(Ser391Alafs*7)
9	c.1170_1179del	p.(Ser391Alafs*7)
9	c.1170_1179del	p.(Ser391Alafs*7)
9	c.1185G>C	p.(Trp395Cys)

Tabella 7. Varianti del gene *TGFB2*

Exon	DNA change (cDNA)	Protein
3	c.???x	p.Arg159*
6	c.???x	p.Arg327Gln
3	c.???x	p.Arg159*
7	c.???x	p.Gly376Gluufs*17
6	c.???x	p.Arg327Trp
6	c.???x	p.Arg327Trp
0	whole gene deletion	p.???x
0	whole gene deletion	p.???x
0	whole gene deletion	p.???x
0	whole gene deletion chr1:215713272-218899968	p.???x
6	c.839-1G>A	p.Gly280Aspfs*41
6	c.839-1G>A	p.Gly280Aspfs*41
1	c.236A>T	p.(Gln79Leu)
1	c.236A>T	p.(Gln79Leu)
1	c.244G>T	p.(Ala82Ser)
1	c.274G>T	p.(Glu92*)
1	c.274G>T	p.(Glu92*)
1	c.294_308delCTACGCCAAGGAGGT	p.(Ala100_Tyr104del)
1	c.297C>A	p.(Tyr99*)
1	c.304G>T	p.(Glu102*)
1	c.305_307delAGG	p.(Glu102del)
3	c.475C>T	p.(Arg159*)
3	c.475C>T	p.(Arg159*)
3	c.475C>T	p.(Arg159*)
3	c.518_519insT	p.(Lys174Gluufs*18)
3	c.577C>T	p.(Arg193Trp)
3	c.577C>T	p.(Arg193Trp)
3	c.577C>T	p.(Arg193Trp)
3	c.577C>T	p.(Arg193Trp)
3	c.577C>T	p.(Arg193Trp)
3	c.577C>T	p.(Arg193Trp)
3	c.577C>T	p.(Arg193Trp)
3	c.577C>T	p.(Arg193Trp)
4	c.673G>T	p.(Glu225*)
4	c.687C>A	p.(Phe229Leu)
6	c.873_888dup	p.Asn297*
6	c.979C>T	p.(Arg327Trp)
6	c.980G>A	p.(Arg327Gln)
6	c.980G>A	p.(Arg327Gln)
6	c.980G>A	p.(Arg327Gln)
6	c.980G>A	p.(Arg327Gln)
6	c.980G>A	p.(Arg327Gln)
6	c.980G>A	p.(Arg327Gln)
6	c.988C>T	p.(Arg330Cys)
6	c.988C>T	p.(Arg330Cys)
6	c.988C>T	p.(Arg330Cys)
6	c.988C>T	p.(Arg330Cys)
6	c.1000delG	p.(Ala334Argfs*25)
7	c.1021_1025delTACAA	p.Tyr341Cysfs*25
7	c.1042C>T	p.(Arg348Cys)
7	c.1042C>T	p.(Arg348Cys)
6	c.1042C>T	p.(Arg348Cys)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1097C>A	p.(Pro366His)
7	c.1106_1110delACAA	p.(Tyr369Cysfs*26)
7	c.1165dupA	p.(Ser389Lysfs*8)
7	c.1170+1G>A	p.?
7	c.1170+1G>A	p.?
7	c.1170+1G>A	p.?
8	c.1234G>C	p.(Asp412His)

Tabella 8. Varianti del gene *TGFB3*

Exon	DNA change (cDNA)	Protein
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
4	c.754+2T>C	p.Glu216_Lys251del
1	c.106A>T	p.Lys36*
2	c.437delT	p.Leu146Hisfs*68
2	c.437delT	p.Leu146Hisfs*68
4	c.704delA	p.Asn235Metfs*11
4	c.704delA	p.Asn235Metfs*11
5	c.787G>C	p.Asp263His
5	c.787G>C	p.Asp263His
5	c.787G>C	p.Asp263His
5	c.787G>C	p.Asp263His
5	c.787G>C	p.Asp263His
5	c.787G>C	p.Asp263His
5	c.796C>T	p.Arg266Cys
5	c.796C>T	p.Arg266Cys
5	c.898C>G	p.Arg300Gly
5	c.898C>G	p.Arg300Gly
5	c.898C>G	p.Arg300Gly
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.898C>T	p.Arg300Trp
5	c.899G>A	p.Arg300Gln
5	c.899G>A	p.Arg300Gln
6	c.965T>C	p.Ile322Thr
6	c.965T>C	p.Ile322Thr
6	c.965T>C	p.Ile322Thr
6	c.979G>T	p.Asp327Tyr
6	c.979G>T	p.Asp327Tyr
6	c.979G>T	p.Asp327Tyr
7	c.1095C>A	p.Tyr365*
7	c.1157delT	p.Leu386Argfs*21
7	c.1202T>C	p.Leu401Pro
7	c.1202T>C	p.Leu401Pro
7	c.1202T>C	p.Leu401Pro
7	c.1226G>A	p.Cys409Tyr

Tabella 9. Varianti del gene *SMAD2*

Exon	DNA change (cDNA)	Protein
8	c.954T>A	p.Asn318Lys
8	c.954T>A	p.Asn318Lys
9	c.1082A>C	p.Asn361Thr
10	c.1163A>G	p.Gln388Arg
10	c.1163A>G	p.Gln388Arg
10	c.1190C>A	p.Ser397Tyr
11	c.1346T>C	p.Leu449Ser
11	c.1369G>A	p.Gly457Arg
11	c.1400C>T	p.Ser467Leu

Tabella 10. Caratteristiche cliniche totali

	Total (n=592)				
	Yes	%yes	No	NA	%NA
/Familial_Inheritance/	213	57,6	157	222	37,5
/Cardiovascular_features/Aortic_dissection/	80	24,4	248	246	42,9
/Cardiovascular_features/Arterial_dissection/	13	19,1	55	524	88,5
/Cardiovascular_features/Aortic_root_aneurysm/	320	75,7	103	169	28,5
/Cardiovascular_features/Aortic_surgery/	152	49,5	155	285	48,1
/Cardiovascular_features/Aortic_tortuosity/	43	27,4	114	435	73,5
/Cardiovascular_features/Arterial_tortuosity/	114	57,6	84	394	66,6
/Cardiovascular_features/Ascending_aortic_aneurysm/	101	41,2	144	347	58,6
/Cardiovascular_features/Arterial_aneurysm/	100	48,8	105	387	65,4
/Cardiovascular_features/Atrial_septal_defect/	20	10,7	167	405	68,4
/Cardiovascular_features/Bicuspid_aortic_valve/	21	11,4	164	407	68,8
/Cardiovascular_features/Mitral_valve_prolapse/	91	36,3	160	341	57,6
/Cardiovascular_features/Other_aortic_aneurysm/	49	27,2	131	412	69,6
/Cardiovascular_features/Patent_ductus_arteriosus/	46	24,0	146	400	67,6
/Craniofacial_features/Cleft_palate/	63	23,2	209	320	54,1
/Craniofacial_features/Craniosynostosis/	41	15,8	219	332	56,1
/Craniofacial_features/Ectopia_lentis/		0,0	226	365	61,8
/Craniofacial_features/Hypertelorism/	176	51,9	163	253	42,7
/Craniofacial_features/Myopia/	63	33,2	127	402	67,9
/Craniofacial_features/Retrognathia/	124	51,0	119	349	59,0
/Craniofacial_features/Sclerae/	85	43,6	110	397	67,1
/Craniofacial_features/Uvula/	178	52,4	162		0,0
/Other_features/Pneumothorax/	8	5,2	146	438	74,0
/Other_features/Severe_allergy/	16	16,8	79	497	84,0
/Skeletal_features/Arachnodactyly/	174	54,0	148	270	45,6
/Skeletal_features/Camptodactyly/	56	25,8	161	375	63,3
/Skeletal_features/Cervical_spine_instability/	27	24,3	84	481	81,3
/Skeletal_features/Club_foot/	88	32,6	182	322	54,4
/Skeletal_features/Dolichostenomelia/	66	33,0	134	392	66,2
/Skeletal_features/Flat_feet/	132	60,3	87	373	63,0
/Skeletal_features/Fractures/	19	22,6	65	508	85,8
/Skeletal_features/Joint_dislocations/	47	29,9	110	435	73,5
/Skeletal_features/Joint_hyperlaxity/	218	70,3	92	282	47,6
/Skeletal_features/Joint_contractures/	10	17,2	48	534	90,2
/Skeletal_features/Osteoarthritis/	33	50,0	33	526	88,9
/Skeletal_features/Osteoporosis/	13	27,7	34		0,0
/Skeletal_features/Pectus_deformity/	206	63,8	117	269	45,4
/Skeletal_features/Scoliosis/	180	55,7	143	269	45,4
/Skeletal_features/Spondylolisthesis/	23	30,3	53	516	87,2
/Skin_integumentum_features/Atrophic_scarring/	31	18,7	135	426	72,0
/Skin_integumentum_features/Dural_ectasia/	46	36,2	81	465	78,5
/Skin_integumentum_features/Easy_bruising/	65	41,1	93	109	40,8
/Skin_integumentum_features/Hernia/	115	50,9	111	366	61,8
/Skin_integumentum_features/Striae/	62	29,1	151	379	64,0
/Skin_integumentum_features/Thin_skin/	93	46,0	109	390	65,9

Tabella 11. Caratteristiche relative al gene *TGFBR1*

	<i>TGFBR1</i> (n=132)				
	Yes	%yes	No	NA	%NA
/Familial_Inheritance/	82	67,2	40	10	7,6
/Cardiovascular_features/Aortic_dissection/	22	26,2	62	48	36,4
/Cardiovascular_features/Arterial_dissection/	1	6,7	14	117	88,6
/Cardiovascular_features/Aortic_root_aneurysm/	79	77,5	23	30	22,7
/Cardiovascular_features/Aortic_surgery/	40	52,6	36	56	42,4
/Cardiovascular_features/Aortic_tortuosity/	3	10,7	25	104	78,8
/Cardiovascular_features/Arterial_tortuosity/	21	55,3	17	94	71,2
/Cardiovascular_features/Ascending_aortic_aneurysm/	26	57,8	19	87	65,9
/Cardiovascular_features/Arterial_aneurysm/	19	54,3	16	97	73,5
/Cardiovascular_features/Atrial_septal_defect/	2	5,7	33	97	73,5
/Cardiovascular_features/Bicuspid_aortic_valve/	6	18,8	26	100	75,8
/Cardiovascular_features/Mitral_valve_prolapse/	11	27,5	29	92	69,7
/Cardiovascular_features/Other_aortic_aneurysm/	10	28,6	25	97	73,5
/Cardiovascular_features/Patent_ductus_arteriosus/	7	21,2	26	99	75,0
/Craniofacial_features/Cleft_palate/	12	19,7	49	71	53,8
/Craniofacial_features/Craniosynostosis/	13	21,3	48	71	53,8
/Craniofacial_features/Ectopia_lentis/		0,0	42	90	68,2
/Craniofacial_features/Hypertelorism/	25	38,5	40	67	50,8
/Craniofacial_features/Myopia/	4	13,3	26	102	77,3
/Craniofacial_features/Retrognathia/	18	48,6	19	95	72,0
/Craniofacial_features/Sclerae/	16	41,0	23	93	70,5
/Craniofacial_features/Uvula/	31	47,0	35		0,0
/Other_features/Pneumothorax/	2	7,7	24	106	80,3
/Other_features/Severe_allergy/	5	50,0	5	122	92,4
/Skeletal_features/Arachnodactyly/	31	58,5	22	79	59,8
/Skeletal_features/Camptodactyly/	4	9,5	38	90	68,2
/Skeletal_features/Cervical_spine_instability/	3	18,8	13	116	87,9
/Skeletal_features/Club_foot/	4	8,7	42	86	65,2
/Skeletal_features/Dolichostenomelia/	11	28,2	28	93	70,5
/Skeletal_features/Flat_feet/	17	47,2	19	96	72,7
/Skeletal_features/Fractures/		0,0	5	127	96,2
/Skeletal_features/Joint_dislocations/	6	24,0	19	107	81,1
/Skeletal_features/Joint_hyperlaxity/	37	69,8	16	79	59,8
/Skeletal_features/Joint_contractures/	3	14,3	18	111	84,1
/Skeletal_features/Osteoarthritis/				132	100,0
/Skeletal_features/Osteoporosis/				132	100,0
/Skeletal_features/Pectus_deformity/	33	60,0	22	77	58,3
/Skeletal_features/Scoliosis/	23	46,0	27	82	62,1
/Skeletal_features/Spondylolisthesis/	1	25,0	3	128	97,0
/Skin_integumentum_features/Atrophic_scarring/	5	16,1	26	101	76,5
/Skin_integumentum_features/Dural_ectasia/	6	30,0	14	112	84,8
/Skin_integumentum_features/Easy_bruising/	9	39,1	14	199	89,6
/Skin_integumentum_features/Hernia/	15	44,1	19	98	74,2
/Skin_integumentum_features/Striae/	7	20,6	27	98	74,2
/Skin_integumentum_features/Thin_skin/	17	47,2	19	96	72,7

Tabella 12. Caratteristiche relative al gene *TGFBR2*

	TGFBR2 (n=247)				
	Yes	%yes	No	NA	%NA
/Familial_Inheritance/	100	46,1	117	20	8,4
/Cardiovascular_features/Aortic_dissection/	37	23,6	120	90	36,4
/Cardiovascular_features/Arterial_dissection/	4	13,8	25	218	88,3
/Cardiovascular_features/Aortic_root_aneurysm/	148	86,0	24	75	30,4
/Cardiovascular_features/Aortic_surgery/	73	53,3	64	110	44,5
/Cardiovascular_features/Aortic_tortuosity/	26	37,7	43	178	72,1
/Cardiovascular_features/Arterial_tortuosity/	65	73,0	24	158	64,0
/Cardiovascular_features/Ascending_aortic_aneurysm/	57	44,9	70	120	48,6
/Cardiovascular_features/Arterial_aneurysm/	55	59,8	37	155	62,8
/Cardiovascular_features/Atrial_septal_defect/	15	16,5	76	156	63,2
/Cardiovascular_features/Bicuspid_aortic_valve/	7	9,2	69	171	69,2
/Cardiovascular_features/Mitral_valve_prolapse/	37	38,5	59	151	61,1
/Cardiovascular_features/Other_aortic_aneurysm/	26	33,3	52	169	68,4
/Cardiovascular_features/Patent_ductus_arteriosus/	38	37,6	63	146	59,1
/Craniofacial_features/Cleft_palate/	40	30,8	90	117	47,4
/Craniofacial_features/Craniosynostosis/	27	20,5	105	115	46,6
/Craniofacial_features/Ectopia_lentis/		0,0	129	118	47,8
/Craniofacial_features/Hypertelorism/	97	70,3	41	109	44,1
/Craniofacial_features/Myopia/	20	26,3	56	171	69,2
/Craniofacial_features/Retrognathia/	62	56,9	47	138	55,9
/Craniofacial_features/Sclerae/	51	50,0	51	145	58,7
/Craniofacial_features/Uvula/	98	63,6	56		0,0
/Other_features/Pneumothorax/	3	4,5	63	181	73,3
/Other_features/Severe_allergy/	7	22,6	24	216	87,4
/Skeletal_features/Arachnodactyly/	87	62,6	52	108	43,7
/Skeletal_features/Campodactyly/	45	42,5	61	141	57,1
/Skeletal_features/Cervical_spine_instability/	22	50,0	22	203	82,2
/Skeletal_features/Club_foot/	68	49,3	70	109	44,1
/Skeletal_features/Dolichostenomelia/	33	35,9	59	155	62,8
/Skeletal_features/Flat_feet/	37	52,9	33	177	71,7
/Skeletal_features/Fractures/	9	36,0	16	222	89,9
/Skeletal_features/Joint_dislocations/	28	41,2	40	179	72,5
/Skeletal_features/Joint_hyperlaxity/	101	78,9	27	119	48,2
/Skeletal_features/Joint_contractures/	7	20,6	27	213	86,2
/Skeletal_features/Osteoarthritis/	3	60,0	2	242	98,0
/Skeletal_features/Osteoporosis/	5	83,3	1	241	97,6
/Skeletal_features/Pectus_deformity/	108	74,5	37	102	41,3
/Skeletal_features/Scoliosis/	91	62,8	54	102	41,3
/Skeletal_features/Spondylolisthesis/	11	57,9	8	228	92,3
/Skin_integumentum_features/Atrophic_scarring/	17	26,2	48	182	73,7
/Skin_integumentum_features/Dural_ectasia/	20	31,3	44	183	74,1
/Skin_integumentum_features/Easy_bruising/	18	37,5	30	55	53,4
/Skin_integumentum_features/Hernia/	52	58,4	37	158	64,0
/Skin_integumentum_features/Striae/	24	32,0	51	172	69,6
/Skin_integumentum_features/Thin_skin/	56	64,4	31	160	64,8

Tabella 13. Caratteristiche relative al gene *SMAD3*

	SMAD3 (n=85)				
	Yes	%yes	No	NA	%NA
/Familial_Inheritance/	28	100,0		57	67,1
/Cardiovascular_features/Aortic_dissection/	22	47,8	24	39	45,9
/Cardiovascular_features/Arterial_dissection/	4	80,0	1	80	94,1
/Cardiovascular_features/Aortic_root_aneurysm/	43	66,2	22	20	23,5
/Cardiovascular_features/Aortic_surgery/	25	56,8	19	41	48,2
/Cardiovascular_features/Aortic_tortuosity/	11	34,4	21	53	62,4
/Cardiovascular_features/Arterial_tortuosity/	14	42,4	19	52	61,2
/Cardiovascular_features/Ascending_aortic_aneurysm/	7	21,2	26	52	61,2
/Cardiovascular_features/Arterial_aneurysm/	18	41,9	25	42	49,4
/Cardiovascular_features/Atrial_septal_defect/		0,0	30	55	64,7
/Cardiovascular_features/Bicuspid_aortic_valve/	3	9,7	28	54	63,5
/Cardiovascular_features/Mitral_valve_prolapse/	12	26,1	34	39	45,9
/Cardiovascular_features/Other_aortic_aneurysm/	5	15,6	27	53	62,4
/Cardiovascular_features/Patent_ductus_arteriosus/	1	3,3	29	55	64,7
/Craniofacial_features/Cleft_palate/		0,0	39	46	54,1
/Craniofacial_features/Craniosynostosis/	1	2,9	33	51	60,0
/Craniofacial_features/Ectopia_lentis/		0,0	24	61	71,8
/Craniofacial_features/Hypertelorism/	18	41,9	25	42	49,4
/Craniofacial_features/Myopia/	11	32,4	23	51	60,0
/Craniofacial_features/Retrognathia/	6	18,8	26	53	62,4
/Craniofacial_features/Sclerae/		0,0	3	82	96,5
/Craniofacial_features/Uvula/	20	41,7	28		0,0
/Other_features/Pneumothorax/	1	3,1	31	53	62,4
/Other_features/Severe_allergy/	3	11,5	23	59	69,4
/Skeletal_features/Arachnodactyly/	12	33,3	24	49	57,6
/Skeletal_features/Camptodactyly/	3	9,4	29	53	62,4
/Skeletal_features/Cervical_spine_instability/	1	4,3	22	62	72,9
/Skeletal_features/Club_foot/	4	11,8	30	51	60,0
/Skeletal_features/Dolichostenomelia/	6	18,8	26	53	62,4
/Skeletal_features/Flat_feet/	27	73,0	10	48	56,5
/Skeletal_features/Fractures/	7	24,1	22	56	65,9
/Skeletal_features/Joint_dislocations/	4	13,8	25	56	65,9
/Skeletal_features/Joint_hyperlaxity/	23	50,0	23	39	45,9
/Skeletal_features/Joint_contractures/		0,0	2	83	97,6
/Skeletal_features/Osteoarthritis/	19	63,3	11	55	64,7
/Skeletal_features/Osteoporosis/	6	30,0	14	65	76,5
/Skeletal_features/Pectus_deformity/	20	46,5	23	42	49,4
/Skeletal_features/Scoliosis/	23	52,3	21	41	48,2
/Skeletal_features/Spondylolisthesis/	8	28,6	20	57	67,1
/Skin_integumentum_features/Atrophic_scarring/	6	20,0	24	55	64,7
/Skin_integumentum_features/Dural_ectasia/	8	50,0	8	69	81,2
/Skin_integumentum_features/Easy_bruising/	12	40,0	18	55	64,7
/Skin_integumentum_features/Hernia/	16	45,7	19	50	58,8
/Skin_integumentum_features/Striae/	7	20,6	27	51	60,0
/Skin_integumentum_features/Thin_skin/	9	25,0	27	49	57,6

Tabella 14. Caratteristiche relative al gene *TGFB2*

	TGFB2 (n=68)				
	Yes	%yes	No	NA	%NA
/Familial_Inheritance/	3	100,0		65	95,6
/Cardiovascular_features/Aortic_dissection/	12	30,8	27	29	42,6
/Cardiovascular_features/Arterial_dissection/	2	33,3	4	62	91,2
/Cardiovascular_features/Aortic_root_aneurysm/	35	70,0	15	18	26,5
/Cardiovascular_features/Aortic_surgery/	10	28,6	25	33	48,5
/Cardiovascular_features/Aortic_tortuosity/	2	11,8	15	51	75,0
/Cardiovascular_features/Arterial_tortuosity/	12	46,2	14	42	61,8
/Cardiovascular_features/Ascending_aortic_aneurysm/	4	20,0	16	48	70,6
/Cardiovascular_features/Arterial_aneurysm/	5	23,8	16	47	69,1
/Cardiovascular_features/Atrial_septal_defect/	2	10,0	18	48	70,6
/Cardiovascular_features/Bicuspid_aortic_valve/	3	9,1	30	35	51,5
/Cardiovascular_features/Mitral_valve_prolapse/	22	44,0	28	18	26,5
/Cardiovascular_features/Other_aortic_aneurysm/	1	6,7	14	53	77,9
/Cardiovascular_features/Patent_ductus_arteriosus/		0,0	19	49	72,1
/Craniofacial_features/Cleft_palate/	4	14,8	23	41	60,3
/Craniofacial_features/Craniosynostosis/		0,0	24	44	64,7
/Craniofacial_features/Ectopia_lentis/		0,0	18	49	73,1
/Craniofacial_features/Hypertelorism/	15	35,7	27	26	38,2
/Craniofacial_features/Myopia/	22	66,7	11	35	51,5
/Craniofacial_features/Retrognathia/	28	62,2	17	23	33,8
/Craniofacial_features/Sclerae/	13	40,6	19	36	52,9
/Craniofacial_features/Uvula/	9	22,0	32		0,0
/Other_features/Pneumothorax/	1	5,3	18	49	72,1
/Other_features/Severe_allergy/		0,0	18	50	73,5
/Skeletal_features/Arachnodactyly/	23	53,5	20	25	36,8
/Skeletal_features/Camptodactyly/	1	4,8	20	47	69,1
/Skeletal_features/Cervical_spine_instability/		0,0	18	50	73,5
/Skeletal_features/Club_foot/	9	22,5	31	28	41,2
/Skeletal_features/Dolichostenomelia/	10	47,6	11	47	69,1
/Skeletal_features/Flat_feet/	29	60,4	19	20	29,4
/Skeletal_features/Fractures/	2	12,5	14	52	76,5
/Skeletal_features/Joint_dislocations/	5	20,8	19	44	64,7
/Skeletal_features/Joint_hyperlaxity/	36	69,2	16	16	23,5
/Skeletal_features/Joint_contractures/		0,0	1	67	98,5
/Skeletal_features/Osteoarthritis/	3	17,6	14	51	75,0
/Skeletal_features/Osteoporosis/	1	8,3	11	56	82,4
/Skeletal_features/Pectus_deformity/	29	55,8	23	16	23,5
/Skeletal_features/Scoliosis/	19	41,3	27	22	32,4
/Skeletal_features/Spondylolisthesis/	1	7,1	13	54	79,4
/Skin_integumentum_features/Atrophic_scarring/	3	14,3	18	47	69,1
/Skin_integumentum_features/Dural_ectasia/	12	60,0	8	48	70,6
/Skin_integumentum_features/Easy_bruising/	16	42,1	22	30	44,1
/Skin_integumentum_features/Hernia/	19	41,3	27	22	32,4
/Skin_integumentum_features/Striae/	17	37,8	28	23	33,8
/Skin_integumentum_features/Thin_skin/	8	33,3	16	44	64,7

Tabella 15. Caratteristiche relative al gene *TGFB3*

	<i>TGFB3</i> (n=51)				
	Yes	%yes	No	NA	%NA
/Familial_Inheritance/					
/Cardiovascular_features/Aortic_dissection/	5	31,3	11	35	68,6
/Cardiovascular_features/Arterial_dissection/		0,0	9	42	82,4
/Cardiovascular_features/Aortic_root_aneurysm/	10	35,7	18	23	45,1
/Cardiovascular_features/Aortic_surgery/	3	21,4	11	37	72,5
/Cardiovascular_features/Aortic_tortuosity/	1	14,3	6	44	86,3
/Cardiovascular_features/Arterial_tortuosity/	1	12,5	7	43	84,3
/Cardiovascular_features/Ascending_aortic_aneurysm/	4	23,5	13	34	66,7
/Cardiovascular_features/Arterial_aneurysm/	2	18,2	9	40	78,4
/Cardiovascular_features/Atrial_septal_defect/	1	9,1	10	40	78,4
/Cardiovascular_features/Bicuspid_aortic_valve/	1	10,0	9	41	80,4
/Cardiovascular_features/Mitral_valve_prolapse/	7	46,7	8	36	70,6
/Cardiovascular_features/Other_aortic_aneurysm/	7	35,0	13	31	60,8
/Cardiovascular_features/Patent_ductus_arteriosus/		0,0	9	42	82,4
/Craniofacial_features/Cleft_palate/	7	53,8	6	38	74,5
/Craniofacial_features/Craniosynostosis/		0,0	9	42	82,4
/Craniofacial_features/Ectopia_lentis/		0,0	11	40	78,4
/Craniofacial_features/Hypertelorism/	20	44,4	25	6	11,8
/Craniofacial_features/Myopia/	6	40,0	9	36	70,6
/Craniofacial_features/Retrognathia/	10	50,0	10	31	60,8
/Craniofacial_features/Sclerae/	4	22,2	14	33	64,7
/Craniofacial_features/Uvula/	19	79,2	5		0,0
/Other_features/Pneumothorax/	1	9,1	10	40	78,4
/Other_features/Severe_allergy/	1	10,0	9	41	80,4
/Skeletal_features/Arachnodactyly/	18	40,0	27	6	11,8
/Skeletal_features/Camptodactyly/	3	25,0	9	39	76,5
/Skeletal_features/Cervical_spine_instability/	1	10,0	9	41	80,4
/Skeletal_features/Club_foot/	3	25,0	9	39	76,5
/Skeletal_features/Dolichostenomelia/	5	38,5	8	38	74,5
/Skeletal_features/Flat_feet/	19	82,6	4	28	54,9
/Skeletal_features/Fractures/	1	11,1	8	42	82,4
/Skeletal_features/Joint_dislocations/	4	36,4	7	40	78,4
/Skeletal_features/Joint_hyperlaxity/	21	80,8	5	25	49,0
/Skeletal_features/Joint_contractures/				51	100,0
/Skeletal_features/Osteoarthritis/	5	45,5	6	40	78,4
/Skeletal_features/Osteoporosis/	1	11,1	8	42	82,4
/Skeletal_features/Pectus_deformity/	13	65,0	7	31	60,8
/Skeletal_features/Scoliosis/	20	69,0	9	22	43,1
/Skeletal_features/Spondylolisthesis/	2	20,0	8	41	80,4
/Skin_integumentum_features/Atrophic_scarring/		0,0	16	35	68,6
/Skin_integumentum_features/Dural_ectasia/		0,0	7	44	86,3
/Skin_integumentum_features/Easy_bruising/	8	53,3	7	36	70,6
/Skin_integumentum_features/Hernia/	9	52,9	8	34	66,7
/Skin_integumentum_features/Striae/	4	22,2	14	33	64,7
/Skin_integumentum_features/Thin_skin/	3	21,4	11	37	72,5

Tabella 16. Caratteristiche relative al gene *SMAD2*

	<i>SMAD2</i> (n=9)				
	Yes	%yes	No	NA	%NA
/Familial_Inheritance/					
/Cardiovascular_features/Aortic_dissection/		0,0	4	5	55,6
/Cardiovascular_features/Arterial_dissection/	2	50,0	2	5	55,6
/Cardiovascular_features/Aortic_root_aneurysm/	5	83,3	1	3	33,3
/Cardiovascular_features/Aortic_surgery/	1	100,0		8	88,9
/Cardiovascular_features/Aortic_tortuosity/		0,0	4	5	55,6
/Cardiovascular_features/Arterial_tortuosity/	1	25,0	3	5	55,6
/Cardiovascular_features/Ascending_aortic_aneurysm/	3	15,8	16	6	24,0
/Cardiovascular_features/Arterial_aneurysm/	1	33,3	2	6	66,7
/Cardiovascular_features/Atrial_septal_defect/				9	100,0
/Cardiovascular_features/Bicuspid_aortic_valve/	1	33,3	2	6	66,7
/Cardiovascular_features/Mitral_valve_prolapse/	2	50,0	2	5	55,6
/Cardiovascular_features/Other_aortic_aneurysm/				9	100,0
/Cardiovascular_features/Patent_ductus_arteriosus/				9	100,0
/Craniofacial_features/Cleft_palate/		0,0	2	7	77,8
/Craniofacial_features/Craniosynostosis/				9	100,0
/Craniofacial_features/Ectopia_lentis/		0,0	2	7	77,8
/Craniofacial_features/Hypertelorism/	1	16,7	5	3	33,3
/Craniofacial_features/Myopia/		0,0	2	7	77,8
/Craniofacial_features/Retrognathia/				9	100,0
/Craniofacial_features/Sclerae/	1	100,0		8	88,9
/Craniofacial_features/Uvula/	1	14,3	6		0,0
/Other_features/Pneumothorax/				9	100,0
/Other_features/Severe_allergy/				9	100,0
/Skeletal_features/Arachnodactyly/	3	50,0	3	3	33,3
/Skeletal_features/Camptodactyly/		0,0	4	5	55,6
/Skeletal_features/Cervical_spine_instability/				9	100,0
/Skeletal_features/Club_foot/				9	100,0
/Skeletal_features/Dolichostenomelia/	1	33,3	2	6	66,7
/Skeletal_features/Flat_feet/	3	60,0	2	4	44,4
/Skeletal_features/Fractures/				9	100,0
/Skeletal_features/Joint_dislocations/				9	100,0
/Skeletal_features/Joint_hyperlaxity/		0,0	5	4	44,4
/Skeletal_features/Joint_contractures/				9	100,0
/Skeletal_features/Osteoarthritis/	3	100,0		6	66,7
/Skeletal_features/Osteoporosis/				9	100,0
/Skeletal_features/Pectus_deformity/	3	37,5	5	1	11,1
/Skeletal_features/Scoliosis/	4	44,4	5		0,0
/Skeletal_features/Spondylolisthesis/		0,0	1	8	88,9
/Skin_integumentum_features/Atrophic_scarring/		0,0	3	6	66,7
/Skin_integumentum_features/Dural_ectasia/				9	100,0
/Skin_integumentum_features/Easy_bruising/	2	50,0	2	5	55,6
/Skin_integumentum_features/Hernia/	4	80,0	1	4	44,4
/Skin_integumentum_features/Striae/	3	42,9	4	2	22,2
/Skin_integumentum_features/Thin_skin/		0,0	5	4	44,4

Discussione

Questo lavoro è il primo a raccogliere una grande casistica di pazienti affetti da LDS dal 2004 ad oggi; infatti, eccetto il secondo lavoro di Loeys del 2006 che riportava una casistica di 52 pazienti, i successivi studi pubblicati nella letteratura scientifica riguardavano singoli case reports o piccole casistiche locali. Complessivamente sono più di 250 i lavori pubblicati riguardanti LDS e i suoi geni causativi, e circa la metà di questi sono dei case reports, dei quali molti pubblicati in riviste di interesse cardiocirurgico e cardiovascolare. Per quanto accuratamente dettagliati per l'ambito specifico, tali articoli purtroppo mancano spesso di dati clinici addizionali e del risultato del test genetico, per cui non selezionabili ai fini dello studio. Alla fine del processo di selezione gli articoli completi dal punto di vista molecolare, sono risultati tuttavia spesso poveri sul piano clinico; le motivazioni possono essere molteplici: alcune casistiche sono descritte da centri di riferimento di diagnostica molecolare che non hanno accesso diretto ai dati fenotipici dei pazienti, altre volte invece in singoli casi non vengono menzionate caratteristiche verosimilmente non rilevanti per il caso in sé, ma che sarebbero utili ai fini di una statistica più grande. Le tabelle 10-16 mostrano anche proprio questo dato "mancante": le percentuali delle caratteristiche per cui la presenza/assenza non è nota/menzionata variano dal 20 all'80%. Questo è chiaramente un limite per la portata della rappresentatività statistica dei dati, e per consentire un confronto esaustivo tra le categorie cliniche in esame.

I casi totali inseriti nel database LOVD sono 592, di cui il 42% dovuti a mutazioni in *TGFBR2*, che risulta pertanto il gene più frequentemente mutato in LDS, seguito da *TGFBR1* mutato nel 22,3% dei casi, *SMAD3* nel 14,3%, *TGFBR2* nell'11,8%, *TGFBR3* nel 8,6% e *SMAD2* nel 1,5%.

La percentuale dei casi familiari, considerando tutti e sei i geni, è del 50%, dato che discorda rispetto alla percentuale di mutazioni germline ereditate del 20%, bias dato dal fatto che la familiarità anamnestica non sempre può essere confermata dal dato molecolare. In generale, appare che un'alta percentuale di casi possano essere familiari, a differenza di quanto riportato inizialmente quando furono descritti principalmente casi sindromici sporadici.

Dall'analisi delle mutazioni causative emergono anche degli hot-spots mutazionali e di fatto in *TGFBR2* il 37% dei casi è dovuto ad alterazioni a carico di quattro residui aminoacidi, Asp446, Arg460, Arg528, Arg537, mentre in

TGFBR1 mutazioni in un solo residuo, Arg487, causano il 26% dei casi. Le mutazioni nei geni dei recettori del TGF-beta, come inizialmente descritto, sono quasi esclusivamente missenso, conformemente all'ipotesi di alterazioni loss-of-function, e non di aploinsufficienza, come responsabili del fenotipo cardiovascolare, per cui si considera preservata la presenza del recettore, seppur mal funzionante. La delezione completa di *TGFBR2* è riportata in un articolo in letteratura (Campbell et al., 2011) in una bambina di 20 mesi con microcefalia, ritardo nelle acquisizioni e lievi note dismorfiche non riconducibili a LDS, in assenza di coinvolgimento cardiovascolare, per cui gli autori concludono con un'ulteriore prova a sfavore dell'aploinsufficienza come possibile meccanismo patogenetico di LDS, considerando tuttavia, data l'età della bambina, una preventiva sorveglianza cardiovascolare. Anche interrogando il database Decipher non emergono casi di delezioni associati a fenotipo cardiovascolare, per quanto lievi note dismorfiche principalmente craniofacciali potenzialmente compatibili con LDS sono talvolta riportate, associabili al noto ruolo di alterato signalling del TGF-beta durante la morfogenesi.

Per quanto riguarda invece gli altri geni, il minor numero di casi non consente osservazioni altrettanto significative, tuttavia in *SMAD3* una mutazione ricorre in 2 casi su 22 (Arg279Lys) e in *TGFB2* due residui sono coinvolti nel 27% dei casi (due mutazioni Arg159X e quattro mutazioni nel residuo Arg327 su un totale di 22). A differenza dei recettori del TGF-beta, per questi geni è stata proposta già dall'inizio l'aploinsufficienza come meccanismo patogenetico, ed a conferma di ciò in questo studio sono state osservate in alta percentuale delezioni e mutazioni frameshift. Nei geni *SMAD* la maggiorparte delle mutazioni sono all'interno del dominio MH2, regione ben conservata e responsabile dell'oligomerizzazione con *SMAD4* e attivazione del signalling Smad-dipendente trascrizionale a valle. Nei geni *TGFB*, invece, un quarto delle mutazioni si trova nel dominio RKKR, sito di clivaggio proteolitico responsabile del rilascio del TGFβ maturo dal peptide di latenza LAP.

Spostandosi nell'ambito fenotipico, non si sono osservate specifiche correlazioni tra mutazioni hot-spot e quadro clinico, confermando l'ampia variabilità clinica del fenotipo LDS. Tuttavia, un limite a queste osservazioni deriva dalla non completezza dei dati clinici dei pazienti riportati in letteratura. La focalizzazione pertanto si è stata sulla caratterizzazione clinica dei sei sottogruppi

della casistica associati rispettivamente a mutazioni a carico di ciascuno dei sei geni.

Innanzitutto, si sono ricercati i casi “tipici” con triade di LDS, così come inizialmente definita la patologia, evidenziando come questi rappresentino comunque una buona percentuale della casistica, seppur minoritaria, costituendo rispettivamente circa un quarto e circa un terzo dei casi con mutazioni in *TGFBR1* e in *TGFBR2*. D’altro canto non sono invece affatto rappresentativi dei casi con mutazioni negli altri quattro geni.

Per quanto riguarda l’iniziale distinzione tra LDS1 e LDS2 con fenotipo cutaneo e cardiovascolare meno aggressivo, i dati dello studio non hanno mostrato una reale distinzione tra queste due entità, in linea con i lavori più recenti che suggerivano un continuum tra le due forme. Inoltre, non sembrano emergere delle differenze tra il fenotipo cardiovascolare correlato a mutazioni in *TGFBR1* e in *TGFBR2*, ad eccezione della tortuosità arteriosa presente quasi quattro volte più frequentemente nei casi correlati a *TGFBR2*.

Altre caratteristiche che sembrano contraddistinguere il fenotipo di *TGFBR2* rispetto a *TGFBR1* sono la presenza di ipertelorismo, di camptodattilia e di piede torto; per le altre caratteristiche cliniche non si evidenziano sostanziali differenze.

I geni *SMAD2/3* e *TGFB2/3* si associano analogamente ad fenotipo cardiovascolare aggressivo, sebbene ulteriori casistiche ben descritte clinicamente si rendono necessarie per poter delineare con maggiore significatività i quadri clinici.

Il fenotipo craniofacciale è meno rappresentato nei casi con mutazioni in *SMAD2/TGFB3*, nello specifico per l’ipertelorismo, l’ugola anomala e la palatoschisi, mentre per *SMAD3/TGFB2* la rappresentatività sembra paragonabile ai *TGFB*. Analogamente le caratteristiche scheletriche quali habitus marfanoide, scoliosi, deformità del petto, aracnodattilia, piede piatto appaiono frequenti anche nei geni *SMAD* e *TGFB*. L’osteoartrite appare ricorrente nei casi *SMAD3* mutati, come originariamente descritto, sebbene sia stata successivamente riportata anche in associazione a mutazioni a carico degli altri geni. I casi *TGFB2* mutati riportano un’alta frequenza di miopia, mentre per i casi *TGFB3* e *SMAD2* mutati l’alta percentuale di dati incompleti non rende possibile delineare un quadro più specifico.

Queste osservazioni mostrano sottili differenze fenotipiche che potrebbero orientare la diagnosi molecolare dell'uno o dell'altro gene sulla base di una accurata valutazione clinica, sebbene tuttavia i fenotipi possano essere spesso sovrapposti.

Nell'ambito invece di una diagnosi differenziale con MFS, un dato importante emerso è l'assenza di ectopia lentis in LDS (in tutti i casi in cui è stata esaminata), per cui tutti i casi con sospetta patologia del connettivo che presentano tale caratteristica dovrebbero iniziare gli approfondimenti genetici con l'analisi del gene *FBNI*. Per quanto riguarda invece i casi di TAAD familiare isolati, una meticolosa raccolta dell'albero genealogico con l'annotazione dell'età del decesso dei familiari, insieme ad attento esame obiettivo, possono fornire elementi suggestivi di LDS, orientando al test genetico che da ultimo può stabilire una diagnosi esatta. In questo contesto assume rilevanza il ruolo della consulenza genetica, e di una stretta collaborazione tra cardiologi/cardiochirurghi e genetisti clinici per riuscire a raggiungere la diagnosi, impostare la sorveglianza clinica e il percorso chirurgico più adeguato per il paziente, nonché fornire delle informazioni sul rischio di ricorrenza e sul rischio di gestazione nelle donne. Infatti, sebbene i dati emersi non confermino l'alta incidenza di complicanze legate alla gravidanza inizialmente riportate nel lavoro di Loeys del 2006, le gestazioni devono comunque essere considerate a rischio e opportunamente monitorate.

In conclusione, questo lavoro descrive una grande casistica di pazienti LDS, definendo a livello molecolare il contributo di ciascun gene e delineando a livello clinico i tratti fenotipici comuni e distintivi per ciascun gene.

Il grande contributo per la comunità scientifica è la fruibilità di tutti i dati raccolti attraverso la disponibilità online della casistica inserita nel database LOVD, facilmente accessibile e consultabile, e continuamente aggiornabile, allo scopo di fornire uno strumento di consultazione per biologi e medici per validare diagnosi molecolari e per confrontare casi clinici col fine ultimo di incrementare la casistica e la conoscenza di questa malattia e quindi ottimizzare la gestione dei pazienti.

Il limite principale di questo lavoro consiste nella mancanza di completezza dei dati clinici e del dato sull'origine delle mutazioni riportati in letteratura, non consentendo statistiche scrupolose.

L'obiettivo futuro, in collaborazione con il Prof. Loeys, è quindi quello di continuare con la raccolta di casi, soprattutto contattando altri centri diagnostici specialistici internazionali, rivalutare i casi noti in follow-up ed aggiornare quindi costantemente il database LOVD.

Bibliografia

- Andelfinger, G., Loeys, B. & Dietz, H. A. Decade of discovery in the genetic understanding of thoracic aortic disease. *Can. J. Cardiol.* 2016;32, 13–25.
- Barbier, M. *et al.* MFAP5 loss-of-function mutations underscore the involvement of matrix alteration in the pathogenesis of familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Am. J. Hum. Genet.* 2014;95, 736–743.
- Bertoli-Avella AM, Gillis E, Morisaki H, Verhagen JM, de Graaf BM, van de Beek G, Gallo E, Kruithof BP, Venselaar H, Myers LA *et al.* Mutations in a TGF-beta ligand, TGFB3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(13):1324-36.
- Bertoli-Avella, A. M. *et al.* Mutations in a TGF-beta ligand, TGFB3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015; 65, 1324–1336.
- Biner S, Rafique AM, Ray I, Cuk O, Siegel RJ, Tolstrup K. Aortopathy is prevalent in relatives of bicuspid aortic valve patients. *J Am Coll Cardiol.* 2009 16;53(24):2288-95.
- Boileau C, Guo DC, Hanna N, Regalado ES, Detaint D, Gong L, Varret M, Prakash SK, Li AH, d'Indy H, Braverman AC, Grandchamp B, Kwartler CS, Gouya L, Santos-Cortez RL, Abifadel M, Leal SM, Muti C, Shendure J, Gross MS, Rieder MJ, Vahanian A, Nickerson DA, Michel JB; National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Go Exome Sequencing Project, Jondeau G, Milewicz DM. TGFB2 mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections associated with mild systemic features of Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2012; Jul 8;44(8):916-21.
- Boileau, C. *et al.* TGFB2 mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections associated with mild systemic features of Marfan syndrome. *Nat. Genet.* 2012;44, 916–921.
- Bolar, N., Van Laer, L. & Loeys, B. L. Marfan syndrome: from gene to therapy. *Curr. Opin. Pediatr.* 2012;24, 498–504.
- Bonderman, D. *et al.* Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation. *Circulation* 1999;99, 2138–2143.

- Bradley, D. T., Badger, S. A., McFarland, M. & Hughes, A. E. Abdominal aortic aneurysm genetic associations: mostly false? A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2016;51, 64–75.
- Carmignac, V. *et al.* In-frame mutations in exon 1 of SKI cause dominant Shprintzen–Goldberg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;91, 950–957.
- Chung, A. W. *et al.* Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ. Res.* 2007;101, 512–522.
- Chung, A. W., Yang, H. H., Radomski, M. W. & van Breemen, C. Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Circ. Res.* 2008;102, e73–e85.
- Coady, M. A. *et al.* Familial patterns of thoracic aortic aneurysms. *Arch. Surg.* 1999;134, 361–367.
- Cohn, R. D. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat. Med.* 2007;13, 204–210.
- Criado, F. J. Aortic dissection: a 250-year perspective. *Tex. Heart Inst. J.* 2011; 38, 694–700.
- Davies RR, Kaple RK, Mandapati D, Gallo A, Botta DM Jr, Elefteriades JA, *et al.* Natural history of ascending aortic aneurysms in the setting of an unreplaced bicuspid aortic valve. *Ann Thorac Surg.* 2007;83:1338-1344.
- de Wit, M. C. *et al.* Combined cardiological and neurological abnormalities due to filamin A gene mutation. *Clin. Res. Cardiol.* 2011;100, 45–50.
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* 2011;43, 491–498.
- Dietz, H. C. *et al.* Marfan syndrome caused by a recurrent *de novo* missense mutation in the fibrillin gene. *Nature.* 1991;352, 337–339.
- Disabella E, Grasso M, Gambarin FI, Narula N, Dore R, Favalli V, *et al.* Risk of dissection in thoracic aneurysms associated with mutations of smooth muscle alpha-actin 2 (ACTA2). *Heart* 2011;97:321-326.

- Dobrin, P. B. & Mrkvicka, R. Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovasc. Surg.* 1994;2, 484–488.
- Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D. & Worch, H. Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules.* 2006;7, 2388–2393.
- Doyle, A. J. *et al.* Mutations in the TGF-beta repressor SKI cause Shprintzen–Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nat. Genet.* 2012;44, 1249–1254.
- Elefteriades, J. A. Thoracic aortic aneurysm: reading the enemy’s playbook. *Yale J. Biol. Med.* 2008; 81, 175–186.
- Engelfriet, P. M., Boersma, E., Tijssen, J. G., Bouma, B. J. & Mulder, B. J. Beyond the root: dilatation of the distal aorta in Marfan’s syndrome. *Heart.* 2006; 92, 1238–1243.
- Everitt MD1, Pinto N, Hawkins JA, Mitchell MB, Kouretas PC, Yetman AT. Cardiovascular surgery in children with Marfan syndrome or Loeys-Dietz syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Jun;137(6):1327-32; discussion 1332-3.
- Foffa I, Ait Ali L, Panesi P, Mariani M, Festa P, Botto N, *et al.* Sequencing of NOTCH1, GATA5, TGFBR1 and TGFBR2 genes in familial cases of bicuspid aortic valve. *BMC Med Genet.* 2013;14:44.
- Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat.* 2011;May;32(5):557-63.
- Fox, J. W. *et al.* Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 1998;21, 1315–1325.
- Franken, R. *et al.* Circulating transforming growth factor-beta as a prognostic biomarker in Marfan syndrome. *Int. J. Cardiol.* 2013; 168, 2441–2446.
- Frischmeyer-Guerrero PA1, Guerrero AL, Oswald G, Chichester K, Myers L, Halushka MK, Oliva-Hemker M, Wood RA, Dietz HC. TGFβ

receptor mutations impose a strong predisposition for human allergic disease. *Sci Transl Med.* 2013;Jul 24;5(195):195ra94.

- Gago-Diaz, M. *et al.* Whole exome sequencing for the identification of a new mutation in TGFB2 involved in a familial case of non-syndromic aortic disease. *Clin. Chim. Acta* 2014;437, 88–92.
- Gallo, E. M. *et al.* Angiotensin II-dependent TGF-beta signaling contributes to Loeys–Dietz syndrome vascular pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 2014;124, 448–460.
- Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, *et al.* Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature.* 2005;437(7056):270-4.
- Girdauskas E, Schulz S, Borger MA, Mierzwa M, Kuntze T. Transforming growth factor-beta receptor type II mutation in a patient with bicuspid aortic valve disease and intraoperative aortic dissection. *Ann Thorac Surg.* 2011;91(5):e70-1. doi: 10.1016/j.athoracsur.2010.12.060.
- Guo DC, Papke CL, Tran-Fadulu V, Regalado ES, Avidan N, Johnson RJ, *et al.* Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *Am J Hum Genet.* 2009;84(5):617-27.
- Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N, *et al.* Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet.* 2007;39(12):1488-93.
- Guo, D. C. *et al.* LOX mutations predispose to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circ. Res.* 2016;118, 928–934.
- Guo, D. C. *et al.* MAT2A mutations predispose individuals to thoracic aortic aneurysms. *Am. J. Hum. Genet.* 2015;96, 170–177.
- Guo, D. C. *et al.* Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat. Genet.* 2007;39, 1488–1493.
- Guo, D. C. *et al.* Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2009;84, 617–627.

- Guo, D. C. *et al.* Recurrent gain-of-function mutation in PRKG1 causes thoracic aortic aneurysms and acute aortic dissections. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;93, 398–404.
- Guo, D. *et al.* Familial thoracic aortic aneurysms and dissections: genetic heterogeneity with a major locus mapping to 5q13-14. *Circulation.* 2001;103, 2461–2468.
- Habashi, J. P. *et al.* Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science.* 2006;312, 117–121.
- Halper, J. Proteoglycans and diseases of soft tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 802, 49–58.
- Halushka MK, Angelini A, Bartoloni G, Basso C, Batoroeva L, Bruneval P, et al. Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association for European Cardiovascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases – nomenclature and diagnostic criteria. *Cardiovasc Pathol* 2016; 25(3): 247-257.
- Hannuksela, M. *et al.* A novel variant in MYLK causes thoracic aortic dissections: genotypic and phenotypic description. *BMC Med. Genet.* 2016;17, 61.
- Hasham, S. N. *et al.* Mapping a locus for familial thoracic aortic aneurysms and dissections (TAAD2) to 3p24-25. *Circulation.* 2003;107, 3184–3190.
- He, R. *et al.* Characterization of the inflammatory and apoptotic cells in the aortas of patients with ascending thoracic aortic aneurysms and dissections. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006;131, 671–678.
- Hildebrand, A. *et al.* Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem. J.* 1994;302, 527–534.
- Huntington K, Hunter AG, Chan KL. A prospective study to assess the frequency of familial clustering of congenital bicuspid aortic valve. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:1809–1812.
- Iseri, S. U. *et al.* Seeing clearly: the dominant and recessive nature of FOXE3 in eye developmental anomalies. *Hum. Mutat.* 2009;30, 1378–1386.

- Keramati, A. R., Sadeghpour, A., Farahani, M. M., Chandok, G. & Mani, A. The non-syndromic familial thoracic aortic aneurysms and dissections maps to 15q21 locus. *BMC Med. Genet.* 2010;11, 143.
- Kolb, M., Margetts, P. J., Sime, P. J. & Gauldie, J. Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2001;280, L1327–L1334.
- Kuang, S. Q. *et al.* FOXE3 mutations predispose to thoracic aortic aneurysms and dissections. *J. Clin. Invest.* 2016;126, 948–961.
- Kuivaniemi, H. *et al.* Update on abdominal aortic aneurysm research: from clinical to genetic studies. *Scientifica (Cairo)* 2014; 564734.
- Lee, V. S. *et al.* Loss of function mutation in LOX causes thoracic aortic aneurysm and dissection in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2016;113, 8759–8764.
- LeMaire, S. A. & Russell, L. Epidemiology of thoracic aortic dissection. *Nat. Rev. Cardiol.* 2011;8, 103–113.
- Leone O, Biagini E, Pacini D, Zagnoni S, Ferlito M, Graziosi M, et al. The elusive link between aortic wall histology and echocardiographic anatomy in bicuspid aortic valve: implications for prophylactic surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;41:322-7.
- Li, X., Zhao, G., Zhang, J., Duan, Z. & Xin, S. Prevalence and trends of the abdominal aortic aneurysms epidemic in general population — a meta-analysis. *PLoS ONE.* 2013; 8, e81260.
- Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, Doyle JJ, Gallo E, Fert-Bober J, Kempers MJ, Fishman EK, Chen Y, Myers L, Bjeda D, Oswald G, Elias AF, Levy HP, Anderlid BM, Yang MH, Bongers EM, Timmermans J, Braverman AC, Canham N, Mortier GR, Brunner HG, Byers PH, Van Eyk J, Van Laer L, Dietz HC, Loeys BL. Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2012; Jul 8;44(8):922-7.
- Lindsay, M. E. *et al.* Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat. Genet.* 2012;44, 922–927.

- Lindsay, M. E., Dietz, H. C. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature*. 2011; 473, 308–316.
- Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, De Backer JF, Oswald GL, Symoens S, Manouvrier S, Roberts AE, Faravelli F, Greco MA, Pyeritz RE, Milewicz DM, Coucke PJ, Cameron DE, Braverman AC, Byers PH, De Paepe AM, Dietz HC. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med*. 2006; Aug 24;355(8):788-98.
- Loeys, B. *et al.* Comprehensive molecular screening of the FBN1 gene favors locus homogeneity of classical Marfan syndrome. *Hum. Mutat*. 2004; 24, 140–146.
- Loeys, B. L. *et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat. Genet*. 2005;37, 275–281.
- Loscalzo ML, Goh DL, Loeys B, Kent KC, Spevak PJ, Dietz HC. Familial thoracic aortic dilation and bicommissural aortic valve: a prospective analysis of natural history and inheritance. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(17):1960–67.
- Loscalzo, M. L. *et al.* Familial thoracic aortic dilation and bicommissural aortic valve: a prospective analysis of natural history and inheritance. *Am. J. Hum. Genet*. 2007:143A, 1960–1967.
- Losenno KL, Goodman RL, Chu MWA. Bicuspid Aortic Valve Disease and Ascending Aortic Aneurysms: Gaps in Knowledge. *Cardiol Res Pract*. 2012; 2012: 145202.
- Maccarrick G, Black JH, Bowdin S, El-Hamamsy I, Frischmeyer-Guerrero PA, Guerrero AL, Sponseller PD, Loeys B, Dietz HC. Loeys-Dietz syndrome: a primer for diagnosis and management. *Genet Med*. 2014;Feb 27.
- Malashicheva, A. *et al.* Phenotypic and functional changes of endothelial and smooth muscle cells in thoracic aortic aneurysms. *Int. J. Vasc. Med.*. 2016;2016, 3107879.
- Mao, N. *et al.* Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in animal model of rat thoracic aortic aneurysm. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg*. 2015;21, 62–70.

- Martufi, G., Gasser, T. C., Appoo, J. J. & Di Martino, E. S. Mechano-biology in the thoracic aortic aneurysm: a review and case study. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2014;13, 917–928.
- Matt P, Habashi J, Carrel T, Cameron DE, Van Eyk JE, Dietz HC. Recent advances in understanding Marfan syndrome: should we now treat surgical patients with losartan? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;135:389-94.
- McKellar SH, Tester DJ, Yagubyan M, Majumdar R, Ackerman MJ, Sundt TM 3rd. Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;134(2):290-6.
- Meester, J. A. *et al.* Loss-of-function mutations in the X-linked biglycan gene cause a severe syndromic form of thoracic aortic aneurysms and dissections. *Genet. Med.* 2016; <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2016.126>.
- Micha D, Guo DC, Hilhorst-Hofstee Y, van Kooten F, Atmaja D, Overwater E, Cayami FK, Regalado ES, van Uffelen R, Venselaar H *et al.* SMAD2 Mutations Are Associated with Arterial Aneurysms and Dissections. *Hum Mutat. J Am Coll Cardiol* 2015;65:1324–36.
- Micha, D. *et al.* SMAD2 mutations are associated with arterial aneurysms and dissections. *Hum. Mutat.* 2015;36, 1145–1149.
- Milewicz DM, Guo DC, Tran-Fadulu V, Lafont AL, Papke CL, Inamoto S, *et al.* Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: focus on smooth muscle cell contractile dysfunction. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:283-302.
- Milewicz, D. M. *et al.* Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms. *Circulation.* 1996;94, 2708–2711.
- Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, Abifadel M, Harada N, Morisaki T, Allard D, Varret M, Claustres M, Morisaki H, Ihara M, Kinoshita A, Yoshiura K, Junien C, Kajii T, Jondeau G, Ohta T, Kishino T, Furukawa Y, Nakamura Y, Niikawa N, Boileau C, Matsumoto N. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2004;Aug;36(8):855-60. Epub 2004 Jul 4
- Monroe, G. R. *et al.* Familial Ehlers–Danlos syndrome with lethal arterial events caused by a mutation in COL5A1. *Am. J. Med. Genet. A* 2015;167, 1196–1203.

- Morisaki H, Akutsu K, Ogino H, Kondo N, Yamanaka I, Tsutsumi Y, et al. Mutation of ACTA2 gene as an important cause of familial and nonfamilial nonsyndromatic thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD). *Hum Mutat.* 2009;30(10):1406-11.
- Morisaki, H. *et al.* Mutation of ACTA2 gene as an important cause of familial and nonfamilial nonsyndromatic thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD). *Hum. Mutat.* 2009;30, 1406–1411.
- Nagashima, H. *et al.* Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis in cystic medial degeneration associated with Marfan’s syndrome. *Circulation* 2001;104, I282–287.
- Neptune, E. R. *et al.* Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat. Genet.* 2003;33, 407–411.
- Newby, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc. Res.* 2006; 69, 614–624.
- Ng, C. M. *et al.* TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J. Clin. Invest.* 2004;114, 1586–1592.
- Padang R, Bagnall RD, Richmond DR, Bannon PG, Semsarian C. Rare non-synonymous variations in the transcriptional activation domains of GATA5 in bicuspid aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(2):277-81.
- Pannu, H. *et al.* Mutations in transforming growth factor-beta receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation.* 2005;112, 513–520.
- Pannu, H. *et al.* MYH11 mutations result in a distinct vascular pathology driven by insulin-like growth factor 1 and angiotensin II. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16, 2453–2462.
- Pomianowski, P. *et al.* Single amino acid deletion in MYH11 segregating in a family with TAAD. *J. Genet. Disor. Genet. Rep.* 2015;4, 1.
- Prakash S, Kuang SQ; GenTAC Registry Investigators, Regalado E, Guo D, Milewicz D. Recurrent Rare Genomic Copy Number Variants and Bicuspid Aortic Valve Are Enriched in Early Onset Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153543.

- Pyeritz, R. E. Heritable thoracic aortic disorders. *Curr. Opin. Cardiol.* 2014; 29, 97–102.
- Rabkin, S. W. Accentuating and opposing factors leading to development of thoracic aortic aneurysms not due to genetic or inherited conditions. *Front. Cardiovasc. Med.* 2015;2, 21.
- Regalado, E. S. *et al.* Exome sequencing identifies SMAD3 mutations as a cause of familial thoracic aortic aneurysm and dissection with intracranial and other arterial aneurysms. *Circ. Res.* 2011;109, 680–686.
- Regalado, E. S. *et al.* Pathogenic FBN1 variants in familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Clin. Genet.* 2016;89, 719–723.
- Renard, M. *et al.* Novel MYH11 and ACTA2 mutations reveal a role for enhanced TGFbeta signaling in FTAAD. *Int. J. Cardiol.* 2013;165, 314–321.
- Roberts WC. The congenitally bicuspid aortic valve. A study of 85 autopsy cases. *Am J Cardiol.* 1970;26(1):72-83.
- Roccabianca, S., Ateshian, G. A. & Humphrey, J. D. Biomechanical roles of medial pooling of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2014;13, 13–25.
- Rohrbach, M. *et al.* Phenotypic variability of the kyphoscoliotic type of Ehlers–Danlos syndrome (EDS VIA): clinical, molecular and biochemical delineation. *Orphanet J. Rare Dis.* 2011;6, 46.
- Sakalihasan, N. *et al.* Family members of patients with abdominal aortic aneurysms are at increased risk for aneurysms: analysis of 618 probands and their families from the Liege AAA Family Study. *Ann. Vasc. Surg.* 2014;28, 787–797.
- Sazonova, O. V. *et al.* Extracellular matrix presentation modulates vascular smooth muscle cell mechanotransduction. *Matrix Biol.* 2015;41, 36–43.
- Schepers, D. *et al.* The SMAD-binding domain of SKI: a hotspot for *de novo* mutations causing Shprintzen–Goldberg syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015;23, 224–228.
- Schwarze, U. *et al.* Haploinsufficiency for one COL3A1 allele of type III procollagen results in a phenotype similar to the vascular form of Ehlers–

Danlos syndrome, Ehlers–Danlos syndrome type IV. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;69, 989–1001.

- Shibamura, H. *et al.* Genome scan for familial abdominal aortic aneurysm using sex and family history as covariates suggests genetic heterogeneity and identifies linkage to chromosome 19q13. *Circulation* 2004;109, 2103–2108.
- Sorrell VL, Panczyk E, Alpert JS. A new disease: bicuspid aortic valve aortopathy syndrome. *Am J Med.* 2012;125(4):322-3
- Stone JR, Bruneval P, Angelini A, Bartoloni G, Basso C, Batoroeva L, et al. Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association for European Cardiovascular Pathology: I. Inflammatory diseases. *Cardiovasc Pathol* 2015; 24(5): 267-78
- Surks, H. K. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circ. Res.* 2007;101, 1078–1080.
- Takeda, N. *et al.* A deleterious MYH11 mutation causing familial thoracic aortic dissection. *Hum. Genome Var.* 2015; 2, 15028.
- Tan EW, Offoha RU, Oswald GL, Skolasky RL, Dewan AK, Zhen G, Shapiro JR, Dietz HC, Cao X, Sponseller PD. Increased fracture risk and low bone mineral density in patients with loeys-dietz syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013;Aug;161A(8):1910-4.
- Tran-Fadulu V Pannu H, Kim DH, Vick GW 3rd, Lonsford CM, Lafont AL, Boccalandro C, Smart S, Peterson KL, Hain JZ, Willing MC, Coselli JS, LeMaire SA, Ahn C, Byers PH, Milewicz DM. Analysis of multigenerational families with thoracic aortic aneurysms and dissections due to TGFBR1 or TGFBR2 mutations. *J Med Genet.* 2009;Sep;46(9):607-13.
- Tutar E, Ekici F, Atalay S, Nacar N. The prevalence of bicuspid aortic valve in newborns by echocardiographic screening. *Am Heart J.* 2005;150(3):513-5.
- van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, Roos-Hesselink JW, de Graaf BM, Verhagen JM, Hoedemaekers YM, Willemsen R, Severijnen LA, Venselaar H, Vriend G, Pattynama PM, Collée M, Majoor-Krakauer D, Poldermans D, Frohn-Mulder IM, Micha D, Timmermans J, Hilhorst-

Hofstee Y, Bierma-Zeinstra SM, Willems PJ, Kros JM, Oei EH, Oostra BA, Wessels MW, Bertoli-Avella AM. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet.* 2011; Feb;43(2):121-6.

- van de Laar IM, van der Linde D, Oei EH, Bos PK, Bessems JH, Bierma-Zeinstra SM, van Meer BL, Pals G, Oldenburg RA, Bekkers JA, Moelker A, de Graaf BM, Matyas G, Frohn-Mulder IM, Timmermans J, Hilhorst-Hofstee Y, Cobben JM, Bruggenwirth HT, van Laer L, Loeys B, De Backer J, Coucke PJ, Dietz HC, Willems PJ, Oostra BA, De Paepe A, Roos-Hesselink JW, Bertoli-Avella AM, Wessels MW. Phenotypic spectrum of the SMAD3-related aneurysms-osteoarthritis syndrome. *J Med Genet.* 2012; Jan;49(1):47-57.
- van de Laar, I. M. *et al.* Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat. Genet.* 2011;43, 121–126.
- Van Hemelrijk C, Renard M, Loeys B. The Loeys-Dietz syndrome: an update for the clinician. *Curr Opin Cardiol.* 2010;Nov;25(6):546-51.
- Van Vlijmen-Van Keulen, C. J., Rauwerda, J. A. & Pals, G. Genome-wide linkage in three Dutch families maps a locus for abdominal aortic aneurysms to chromosome 19q13.3. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2005; 30, 29–35.
- Vandeweyer, G., Van Laer, L., Loeys, B., Van den Bulcke, T., and Kooy, R. F. VariantDB: a flexible annotation and filtering portal for next generation sequencing data. *Genome Med.* 2014;6:746.
- Vardulaki, K. A. *et al.* Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.* 2000; 87, 195–200.
- Vaughan, C. J. *et al.* Identification of a chromosome 11q23.2-q24 locus for familial aortic aneurysm disease, a genetically heterogeneous disorder. *Circulation.* 2001;103, 2469–2475.
- Verstraeten, A., Alaerts, M., Van Laer, L. & Loeys, B. Marfan syndrome and related disorders: 25 years of gene discovery. *Hum. Mutat.* 2016;37, 524–531.

- Wang, L. *et al.* Mutations in myosin light chain kinase cause familial aortic dissections. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;87, 701–707.
- Wenstrup, R. J. *et al.* Prevalence of aortic root dilation in the Ehlers–Danlos syndrome. *Genet. Med.* 2002;4, 112–117.
- Williams JA, Loeys BL, Nwakanma LU, Dietz HC, Spevak PJ, Patel ND, François K, DeBacker J, Gott VL, Vricella LA, Cameron DE. Early surgical experience with Loeys-Dietz: a new syndrome of aggressive thoracic aortic aneurysm disease. *Ann Thorac Surg.* 2007;Feb;83(2):S757-63.
- Wong, D. R., Willett, W. C. & Rimm, E. B. Smoking, hypertension, alcohol consumption, and risk of abdominal aortic aneurysm in men. *Am. J. Epidemiol.* 2007; 165, 838–845.
- Yeowell, H. N. *et al.* Deletion of cysteine 369 in lysyl hydroxylase 1 eliminates enzyme activity and causes Ehlers–Danlos syndrome type VI. *Matrix Biol.* 2000;19, 37–46.
- Yetman AT. Cardiovascular pharmacotherapy in patients with Marfan syndrome. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2007;7:117-26.
- Zhang, X., Shen, Y. H. & LeMaire, S. A. Thoracic aortic dissection: are matrix metalloproteinases involved? *Vascular.* 2009;17, 147–157.
- Zhu, L. *et al.* Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat. Genet.* 2006;38, 343–349.