Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.129 Wed, 02 Jul 2025, 02:11:55

[LE SOCIETÀ SCIENTIFICHE]

Sindromi malformative e tumori: novità e conferme

Alcune patologie dimostrano che esiste l'affascinante prospettiva di una personalizzazione del rischio neoplastico e, conseguentemente, dei protocolli di follow-up a seconda della tipologia di difetto genetico di base.

Società Italiana
Malattie Genetiche
Pediatriche e
Disabilità congenite

Introduzione

Si stima che circa il 5-10% di tutte le neoplasie diagnosticate in età pediatrica insorga in bambini che presentano dalla nascita un "difetto" genetico che li predispone allo sviluppo del cancro.[1] In questo ambito si inseriscono le sindromi genetiche associate ad un aumentato rischio di sviluppo di neoplasia. Le aumentate conoscenze in ambito di difetti di base delle diverse sindromi genetiche dimostrano che i geni, le cui mutazioni somatiche causano tumore, sono a volte i medesimi che regolano lo sviluppo embrionale e le cui mutazioni germinali sottendono lo sviluppo di specifiche sindromi. Questo ha consentito a Bellacosa di segnalare come i processi di embriogenesi e quelli di oncogenesi siano similari pur viaggiando in direzione opposta.[2] Nell'embriogenesi infatti si parte da cellule altamente indifferenziate la cui regolazione genetica porta allo sviluppo di cellule, tessuti ed organi altamente differenziati e rigorosamente organizzati, in cui una mutazione genetica germinale porta ad un processo organogenetico anomalo; nella oncogenesi, la mutazione genomica somatica in cellule differenziate porta quel gruppo di cellule ad evolvere in senso opposto verso elementi altamente indifferenziati e fortemente anarchici nella loro crescita ed organizzazione tessutale. In linea con questa prospettiva Bellacosa ricorda come nell'ambito delle condizioni sindromiche la componente malformativa (disembriogenetica) è spesso coesistente con una componente onco-predisponente. A seconda delle diverse condizioni prevarrà in modo significativo l'una o l'altra componente. Ecco che quindi avremo:

- condizioni in cui i difetti genomici si esprimono quasi esclusivamente o prevalentemente con anomalie dello sviluppo, cui si associa un lieve incremento del rischio oncologico (es. raspatie, sindrome di Down);
- forme in cui anomalie dello sviluppo e rischio oncologico sono ugualmente consistenti (facomatosi, sindromi associate a mutazioni di PTEN, sindromi con iper accrescimento);
- forme in cui il rischio oncologico è decisamente preponderante rispetto al difetto di sviluppo (sindromi autosomiche recessive con fragilità cromosomica, sindromi con predisposizione al cancro autosomiche dominanti).

Abbiamo scelto di discutere di seguito alcune sindromi malformative, soprattutto all'interno delle prime due categorie, in rapporto alla loro frequenza e/o alla rilevanza del rischio tumorale.

Sindromi malformative con lieve incremento del rischio oncologico

Sindrome di Down

La Sindrome di Down (SD) rappresenta una delle patologie cromosomiche frequenti. È dato acquisito che l'1-2% dei soggetti affetti da SD svilupperà una leucemia mieloide (LMA) o linfatica acuta (LLA), 10-30 su 100 svilupperanno un disordine mieloproliferativo transitorio (TMD) entro il secondo mese di vita che nella gran parte dei casi andrà incontro a risoluzione (85-90%) ma che nel 20-30% dei casi successivamente potrà evolvere in mielodisplasia e in ultima analisi in LMA. È in corso uno studio europeo per valutare se il trattamento con basse dosi di citarabina delle TMD sia in grado di ridurre il rischio di evoluzione in LMA. Nel cammino verso lo sviluppo della LMA nella SD il "primo passo" è rappresentato proprio dalla trisomia 21 che comporta un aumento della proliferazione dei

Alessandra Di Cesare Merlone
Silvia Tajé
Angelo Selicorni
Unità Operativa Complessa di Pediatria, ASST Lariana, Como

Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.129 Wed, 02 Jul 2025, 02:11:55

progenitori megacariocitopoietici nel fegato del feto; il "secondo passo" da mutazione somatica del gene GATA 1 che determina un blocco della differenziazione della linea megacariocitica; il terzo passo è ancora oggetto di approfondimento e numerosi sono gli studi che stanno valutando numerosi geni e modificazioni epigenetiche. Lo studio della leucemogenesi nella SD ha permesso di documentare gli aspetti peculiari sia in termini di immunofenotipo dei blasti leucemici (prevalenza di LMA megacarioblastica M7 con immunofenotipo diverso da quello delle forme di LMA M7 sporadica) sia in termini di maggiore sensibilità degli stessi ad alcuni farmaci chemioterapici (citarabina nella LMA) piuttosto che in termini di maggiore tossicità di alcuni altri farmaci (metotrexate nella LLA) richiedendo in quest'ultimo caso riduzione della dose del farmaco somministrato. Per contro la prevalenza dei tumori solidi tipici dell'infanzia (neuroblastoma, retinoblastoma, nefroblastoma, glioma) presenta una minore frequenza nei pazienti affetti da SD identificando un ruolo protettivo giocato da proteine codificate da geni presenti sul cromosoma 21 e quindi in triplice copia in questi pazienti.[3] Alla luce di queste considerazioni in un bambino affetto da SD è indicato secondo linee guida internazionali effettuare un emocromo con formula entro il primo mese di vita ovviamente da anticipare in caso di sospetto clinico (epatospleomegalia, ittero, manifestazioni emorragiche, distress respiratorio). Nei pazienti con TMD andranno ripetuti un controllo clinico e l'esame emocromocitometrico ogni 3 mesi fino ai 4 anni di età poiché dopo i 4 anni l'incidenza di leucemia si riduce in maniera significativa.[4]

Rasopatie

Con questo termine si indicano quelle sindromi autosomiche dominanti le cui mutazioni germinali si verificano a carico di geni che codificano per molecole coinvolte nel pathway RAS/RAF/MEK/ERK, via metabolica implicata nella regolazione della crescita cellulare. Le principali condizioni che rientrano in questo gruppo sono la sindrome di Noonan (SN), la s indrome Leopard (SL), la sindrome cardio-facio-cutanea (SCFC) e la sindrome di Costello (SC). Tra queste la SN è particolarmente frequente pur mostrando una grande variabilità di espressione fenotipica che rende a volte non immediato il suo riconoscimento. L'incidenza cumulativa di tumore a 20 anni ha un range che si aggira tra il 4% nella SN/SL e il 15% nella SC mentre è decisamente più basso nella SCFC. All'interno di questo gruppo la SN può essere a buon titolo assunta ad esempio della stretta relazione tra sindromi malformative e tumori. Differenti mutazioni del medesimo gene (PTPN11) possono infatti causare lo sviluppo della condizione sindromica quando l'insorgenza è germinale o quella di una leucemia, se la mutazione avviene a livello somatico. Solo raramente la stessa mutazione descritta a livello somatico in una forma estremamente aggressiva di leucemia della prima infanzia (leucemia mielo-monocitica giovanile, JMML) può essere presente, a livello germinale, dando luogo alla nascita di bambini affetto da SN che potranno sviluppare una forma "attenuata" di JMML. Sempre nei pazienti con SN possono essere osservati tumori solidi, quali rabdomiosarcoma embrionale, neuroblastoma, astrocitoma pilocitico.

Nella SC è descritto un aumento ancor più significativo dell'incidenza di neoplasie solide; il rabdomiosarcoma e il neuroblastoma in epoca precoce, mentre a partire dagli 11 anni compare il rischio del carcinoma vescicale Per poter screenare la comparsa di rabdo/neuroblastoma è utile eseguire oltre alla valutazione clinica, ecografie addominali e pelviche con cadenza trimestrale fino ai 4 anni poi ogni 6 mesi fino a 11 anni. A partire dall'età di 10 anni è utile eseguire annualmente esame urine per ematuria ed esame citologico al fine di valutare la possibile insorgenza del carcinoma vescicale.

Sindromi malformative con moderato incremento del rischio oncologico

Neurofibromatosi di tipo 1

La neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) è una condizione clinica con una frequenza di circa 1:2.000, una trasmissione autosomico dominante, ed un difetto di base

Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.129 Wed, 02 Jul 2025, 02:11:55

Circa il 5–10% di tutte le neoplasie diagnosticate in età pediatrica insorge in bambini che presentano dalla nascita un "difetto" genetico predisponente allo sviluppo del cancro.

rappresentato da mutazioni del gene oncosoppressore NF1 localizzato sul cromosoma 17 in regione q11.2. Tali mutazioni producono un'inattivazione della neurofibromina, proteina che a sua volta svolge un'azione regolatrice negativa sulla cascata RAS-MAPK. La storia naturale della condizione prevede un alto rischio di sviluppo sia di tumori benigni (neurofibromi, xantogranulomi) che di neoplasie maligne pari a 4 volte quello della popolazione generale. Fra i tumori maligni, alcuni insorgono nell'età pediatrica, come il glioma del nervo ottico o la leucemia mieloide; altri sono più tipici dell'adulto, come il feocromocitoma, o hanno un rischio aumentato per tutta la vita, come i gliomi cerebrali o i tumori maligni dei nervi periferici.

I protocolli di follow-up di questa condizione sono stati ampiamente dibattuti negli anni soprattutto per quanto riguarda il ricorso periodico ad indagini di imaging per ricercare eventuali tumori asintomatici; nella maggioranza dei casi la scelta operata è quella di una valutazione annuale alla ricerca dell'eventuale presenza di sintomi o di segni indiretti di queste lesioni (es. riduzione del visus/anomalie del fundus oculi nei gliomi, sviluppo puberale anticipato in lesioni ipotalamiche).[5]

Sindromi da mutazione del gene PTEN

PTEN è un gene onco-soppressore; il suo prodotto proteico si oppone infatti all'azione della proteina PI3K, essenziale per l'attivazione di Akt, fattore pro-tumorale. La perdita di funzione di PTEN si traduce in un aumento della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, portando ad oncogenesi.

Le patologie causate da mutazioni del gene PTEN, tutte legate a mutazioni dominanti, sono state accomu-nate in un gruppo chiamato PTEN Hamartoma Tumor Syndrome (PHTS) che comprende una serie di fenotipi clinici in passato considerati tra loro differenti, quali la sindrome di Cowden e la sindrome di Bannayan-Riley-Ruvalcaba.

Caratteristica della PHTS è una importante macrocrania cui si associano spesso amartomi del tratto gastrointestinale e lesioni cutanee; spesso i pazienti con PHTS giungono all'attenzione del genetista per inquadramento in ritardo psicomotorio/deficit intellettivo.

La PHTS predispone all'insorgenza di neoplasie soprattutto nell'età adulta, inclusi tumore al seno, neoplasie renali, endometriali, tiroidee e del colon, tumori cutanei. È stato calcolato che, nel corso della vita, donne con mutazione PTEN hanno un rischio di tumore al seno compreso fra il 77% e l'85%, soprattutto a partire dai 30 anni di età.

In età pediatrica sono segnalate neoplasie a carico di tiroide e cute (melanomi); per tale motivo in questa epoca della vita è indicato un monitoraggio delle eventuali lesioni cutanee e screening ecografico tiroideo annuale.[6]

Sindromi da iperaccrescimento

Si tratta di condizioni cliniche caratterizzate da un eccesso di crescita pre e postnatale, che interessa sia la statura che il peso. Possono essere o meno associate a note dismorfiche, specifiche anomalie strutturali, ritardo psicomotorio. In riferimento alla tematica in oggetto presentano una varia predisposizione all'insorgenza di neoplasie.

Sindrome di Sotos. La sindrome di Sotos (1:14.000 nati vivi) è caratterizzata da iperaccrescimento staturo-ponderale alla nascita e più evidente nei primi anni di vita. Le caratteristiche somatiche prevedono macrodolicocefalia e specifiche anomalie minori del viso; talvolta sono associate a difetti cardiaci o renali. Il 30-50% dei pazienti Sotos presenta crisi convulsive; la maggioranza dei soggetti affetti presenta ritardo psicomotorio/disabilità intellettiva lieve moderata. Nel 90% dei casi il difetto genetico è una mutazione del protooncogene NSD1, che probabilmente ha un ruolo come oncosoppressore: mutazioni somatiche di NSD1 sono state riscontrate nella leucemia mieloide giovanile, nel neuroblastoma e glioma, in alcuni carcinomi del tratto digerente e respiratorio. Nonostante il rischio teorico, solo il 3% dei soggetti Sotos sviluppa una

Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.129 Wed, 02 Jul 2025, 02:11:55

neoplasia, solitamente nell'età evolutiva. I tumori più frequenti sono il tumore di Wilms, epatocarcinoma, tumore misto della paratiroide, tumori neuro ectodermici, osteocondroma, neuroblastoma, emangiomi multipli, linfoma non-Hodgkin, LLA, carcinoma a piccole cellule del polmone, tumore testicolare, carcinoma vaginale, fibroma del ventricolo sinistro, fibromi ovarici e granuloma a cellule giganti della mandibola. A causa della bassa incidenza e della difficoltà di screening precoce per tali tumori, non è previsto uno follow-up oncologico nei pazienti con sindrome di Sotos.[7]

Sindrome di Weaver. La sindrome di Weaver è caratterizzata da iperaccrescimento, alterazioni metafisarie specifiche, tratti somatici peculiari e macrocefalia; sono talvolta osservati difetti cardiaci. I pazienti affetti mostrano un grado variabile di ritardo psico-motorio/disabilità intellettiva. La base biologica è rappresentata da mutazioni germinali dominati del gene EZH2, coinvolto nell'oncogenesi per lo sviluppo di neoplasie del sistema ematopoietico dopo mutazioni somatiche attivanti o inattivanti. Nel 5% dei soggetti con sindrome di Weaver si evidenziano linfomi, leucemie acute linfoblastiche, neuroblastomi o teratomi sacrococcigei; anche in questo caso non è strutturabile un protocollo di screening clinico strumentale per monitoraggio del rischio neoplastico.

Sindrome di Beckwith Wiedemann. La sindrome di Beckwith Wiedemann (BWS) è la più comune fra le patologie congenite da iperaccrescimento associata a predisposizione a neoplasia. Le caratteristiche cliniche comprendono un'associazione molto variabile fra macrosomia neonatale, iperaccrescimento postnatale, difetti della parete addominale, macro-glossia, anomalie auricolari, emi-ipertrofia, organomegalia, ipoglicemia. La BWS è causata dall'alterata e-spressione di 2 cluster di geni implicati nel controllo della crescita e del ciclo cellulare, mediante diversi meccanismi che coinvolgono 2 regioni di controllo dell'imprinting indipendenti (ICR1 e ICR2) sul cromosoma 11p15.5. Dati recenti di letteratura hanno dimostrato come il rischio neoplastico sia fortemente correlato alla tipologia del difetto molecolare di base: la prevalenza di tumori è stimata intorno al 7,4% sul totale dei pazienti, ma può variare dal 22,8–28% nei soggetti con mutazione ICR1-GoM al 2,6% nei pazienti con ICR2-LoM (classe genotipica più frequente).[8,9] Le neoplasie di riscontro più frequente nella BWS sono il tumore di Wilms (95% dei casi), l'epatoblastoma, il neuroblastoma, l'adrenocarcinoma e il rabdomiosarcoma; anche la tipologia di tumore sembra in qualche misura essere correlato al tipo di mutazione genetica (tumore di Wilms più frequente in ICR1-GoM, epatoblastoma in UPD, adrenocarcinoma quasi esclusivo di UPD). L'età media di insorgenza è di 12 mesi per epatoblastoma e di 24 mesi per il tumore di Wilms.

Alla luce di queste evidenze sono stati recentemente pubblicati due lavori in cui viene proposta una variazione del classico protocollo di follow-up per il monitoraggio del rischio neoplastico che verrebbe ora diversificato e personalizzato in base allo specifico genotipo presentato dal paziente.[8,9]

Miscellanea

Le sindromi discusse non esauriscono certo l'ampio capitolo delle condizioni *cancer predisposing*. Ricordiamo ad esempio l'associazione tra sindrome di Gorlin e medulloblastoma; anemia di Fanconi e mielodisplasia/leucemia; Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP) e tumore al colon retto; sindrome di Rubinstein-Taybi e rabdomiosarcoma, neuroblastoma, feocromocitoma, medulloblastoma, leiomiosarcoma, seminoma, pilomatrixoma e più raramente leucemie e linfomi; sindrome Proteus e meningioma, adenocarcinoma papillare dei testicoli, cistoadenoma ovarico. Non va poi dimenticato che le nuove tecnologie genomiche (cario-tipo molecolare in particolare) possono mostrare la presenza di

Nella NF1 i protocolli di follow-up sono stati dibattuti negli anni soprattutto relativamente al ricorso periodico ad indagini di imaging per ricercare eventuali tumori asintomatici.

Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.129 Wed, 02 Jul 2025, 02:11:55

Tabella 1. Presenza/assenza di protocolli di follow-up per il monitoraggio del rischio oncologico in alcune sindromi genetiche.

Sindrome	*Neoplasie associate*	*Incidenza*	*Età di picco insorgenza*	*Esistenza di un protocollo/follow-up*
Sdr di Down	LMA LLA	1–2%	0–4 aa	Non definito un protocollo specifico
Rasopatie: Noonan/Leopard	JMML, LMA, LLA Rabdomiosarcoma Neuroblastoma Astrocitoma pilocitico	4%	< 8–10aa	Non definito un protocollo specifico
Costello	Rabdomiosarcoma neuroblastoma	15%	Prima infanzia	Screening specifico
	Carcinoma vescica		>10aa	
NF1	Glioma nervo ottico Leucemia mieloide	15%	infanzia	Valutazione clinica strumentale periodica nell'ambito del protocollo della codnizione
	Feocromocitoma	2%	Adulto	
	Gliomi cerebrali	3,5%	Lifelong	
	Tumori maligni dei nervi periferici	8–13%		
PHTS	Tumore seno Tumore tiroide	77–85%	> 30 aa	Screening specifico
	Melanoma		Infanzia	
Sdr di Sotos	Tumore di Wilms, epatocarcinoma, tumore misto della paratiroide, tumori neuro ectodermici, osteocondroma, neuroblastoma,emangiomi multipli, linfoma non-Hodgkin, LLA, carcinoma a piccole cellule del polmone, tumore testicolare, carcinoma vaginale, fibroma del ventricolo sinistro, fibromi ovarici e granuloma a cellule giganti della mandibola	3%	Infanzia	Non definito un protocollo specifico
Srd di Weaver	Linfomi LLA Neuroblastoma Teratomi Sacrococcigei	5%	Infanzia	Non definito un protocollo specifico
BWS	Tumore di Wilms Epatoblastoma Neuroblastoma Adrenocarcinoma Rabdomiosarcoma	7,4% variabile	Infanzia (<4-10 anni)	Proposto recentemente un protocollo diversificato in base a difetto genetico
Sdr di Gorlin	Medulloblastoma	5–10%	0–5 anni	Protocollo specifico
Anemia di Fanconi	Mielodisplasia/leucemia	7–9%	Media 15 aa	Protocollo specifico
Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP)	Tumore del colon retto	90%	< 40 aa	Protocollo specifico
Sdr di Rubinstein-Taybi	Rabdomiosarcoma Neuroblastoma Feocromocitoma Medulloblastoma Leiomiosarcoma Seminoma Pilomatrixoma Leucemie e linfomi (raro)	Circa 10%	< 15 aa	Non definito un protocollo specifico
Sdr di Proteus	Meningioma Adenocarcinoma papillare dei testicoli Cistoadenoma ovarico	Non nota		Non definito un protocollo specifico
Sdr di WAGR	Tumore di Wilms	Sino al 50%	<7 aa	Protocollo specifico
Sdr di Dennis Drash	Tumore di Wilms	Sino al 70%	<7aa	Protocollo specifico

Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.129 Wed, 02 Jul 2025, 02:11:55

L'applicazione di protocolli ad hoc, ove esistenti, offre ai genitori la possibilità di una diagnosi precoce di tumore ma, allo stesso tempo, introduce un forte elemento di ansia e preoccupazione.

microdelezioni cromosomiche rare/rarissime coinvolgenti geni oncosoppressori noti (ad esempio gene PTEN, gene RB1, ecc.) in cui la perdita di una copia del gene stesso induce una predisposizione allo sviluppo di neoplasia. La sindrome WAGR (tumore di Wilms, aniridia, anomalie genito-urinarie e ritardo mentale) secondaria a microdelezioni 11p13 coinvolgenti contemporaneamente il gene PAX6 e WT1, ne rappresenta un esempio da tempo noto. Considerata la vastità delle possibili relazioni tra sindromi genetiche e neoplasie abbiamo ritenuto utile riportare in Tabella 1 alcune delle più note sindromi genetiche associate ad aumentato rischio oncologico con le spe-cifiche neoplasie associate.

Conclusioni

La maggiore conoscenza della storia naturale di molte condizioni sindromiche ne ha svelato in modo sempre più chiaro la possibile correlazione con lo sviluppo di neoplasie. Ciò ha via via comportato, ove possibile, l'adozione di protocolli di monitoraggio mirati, volti ad una precoce diagnosi della neoplasia stessa, al fine di avere una più elevata possibilità di trattamento e guarigione. La stessa conoscenza della biologia di queste condizioni ha confermato i legami assai stretti tra anomalie dello sviluppo ed oncogenesi. Come ben dimostrato in alcune patologie (BWS) esiste addirittura l'affascinante prospettiva di una personalizzazione del rischio neoplastico e, conseguentemente, dei protocolli di follow-up a seconda della tipologia di difetto genetico di base.

L'applicazione di questi protocolli, ove esistenti, offre ai genitori la possibilità di una diagnosi precoce di tumore ma, allo stesso tempo, introduce un forte elemento di ansia e preoccupazione. Tale situazione psicologica è ancora più difficile in quelle condizioni nelle quali, ad un aumento del rischio oncologico, non si associa la possibilità di effettuare un monitoraggio specifico. Queste riflessioni impongono una attenzione specifica a questo corpus emozionale che indubbiamente condiziona il benessere emotivo dell'intero nucleo familiare.

Da ultimo la sempre più profonda conoscenza dei meccanismi di biologici che sottendono oncogenesi ed insorgenza di condizioni sindromiche apre, almeno sul piano teorico, ad interessanti e promettenti spunti per lo sviluppo di nuovi potenziali trattamenti delle sindromi stesse attraverso l'utilizzo di principi attivi noti nella terapia oncologica ■

Gli autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse.

Bibliografia

1. **D'Orazio JA.** Inherited cancer syndromes in children and young adults. J Pediatr Hematol Oncol 2010;32:195-228.
2. **Bellacosa A.** Developmental disease and cancer: biological and clinical overlaps. Am J Med Genet 2013;161A:2788-96.
3. **Xavier AC, Ge Y, Taub JW.** Down syndrome and malignancies: a unique clinical relationship. J Mol Diagn 2009; 11:371-80.
4. **Mateos MK, Barbaric D, Byatt SA, *et al.*** Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. Transl Pediatr 2015;4:76-92.
5. **Ferner RE, Huson SM, Kirby A, *et al.*** Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. J Med Genet 200;44:81-8.
6. **Bubien V, Bonnet F, Brouste V, *et al.*** High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome. J Med Genet 2013;50:255-63.
7. **Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, *et al.*** Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. Am J Hum Genet 2005;77:193-204.
8. **Mussa A, Molinatto C, Ferrero GB, *et al.*** Cancer risk in beckwith-wiedemann syndrome: a systematic re-view and meta-analysis outlining a novel (epi)genotype specific histotype targeted screening protocol. J Pediatr 2016;176:142-9.
9. **Maas SM, Vansenne F, Hennekam RC, *et al.*** Phenotype, cancer risk, and surveillance in beckwith–wiedemann syndrome depending on molecular genetic subgroups. Am J Med Genet 2016;170:2248-60.