

PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

CASI CLINICI PER IMPARARE E TECNICHE DIAGNOSTICHE INNOVATIVE IN PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

Tecniche diagnostiche innovative in fisiologia
respiratoria: il Multiple Breath Washout (MBW)
nell'asma in età pediatrica

La genetica molecolare:
casi clinici per imparare

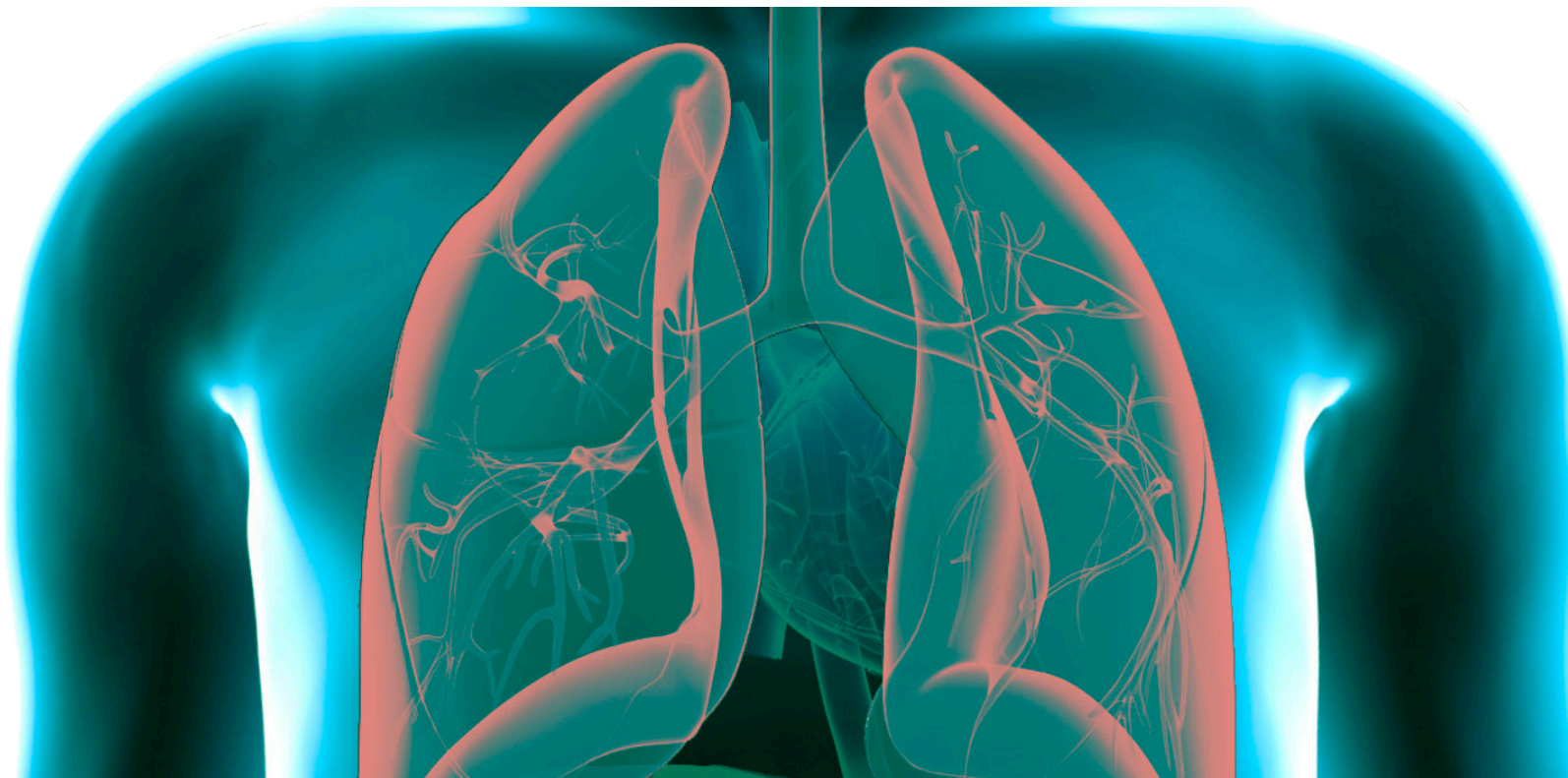
L'ecografia polmonare per il pediatra

Interventistica in pneumologia: dilatazione tracheo-
bronchiale tramite balloon e "cutting" balloon

Allergologia molecolare

Studi del sonno

Allergologia molecolare



INDICE

Editoriale

Valeria Caldarelli

3

Tecniche diagnostiche innovative in fisiologia respiratoria: il Multiple Breath Washout (MBW) nell'asma in età pediatrica

Giuliana Ferrante, Maria Furno

4

La genetica molecolare: casi clinici per imparare

Federica Porcaro, Carlo De Pieri

12

L'ecografia polmonare per il pediatra

Giuseppe Gallo, Simone Fontijn, Elena Proietti, Giulia Cangiano, Matteo Giuliari, Valeria Lucianer, Francesca Sorrentino, Grazia Dinnella, Lorenzo Iughetti, Ugo Pradal

21

Interventistica in pneumologia: dilatazione tracheo-bronchiale tramite balloon e "cutting" balloon

Antonella Frassanito, Antonino Francesco Capizzi

31

Allergologia molecolare

Carla Mastrorilli, Paola Di Filippo

37

Studi del sonno

Ambra Nicolai, Alessandro Onofri

45

Indagine sulla formazione in pneumologia pediatrica nelle scuole di specializzazione in pediatria

Maria Di Cicco, Valeria Caldarelli, Sylvie Tagliati, Vincenzo Insinga, Roberto Raschetti, Renato Cutrera

54

Pneumologia Pediatria

Volume 18, n. 71 - settembre 2018

Direttore Responsabile

Francesca Santamaria (Napoli)

Direzione Scientifica

Stefania La Grutta (Palermo)

Nicola Ullmann (Roma)

Segreteria Scientifica

Silvia Montella (Napoli)

Comitato Editoriale

Angelo Barbato (Padova)

Filippo Bernardi (Bologna)

Alfredo Boccaccino (Misurina)

Attilio L. Boner (Verona)

Mario Canciani (Udine)

Carlo Capristo (Napoli)

Fabio Cardinale (Bari)

Salvatore Cazzato (Bologna)

Renato Cutrera (Roma)

Fernando M. de Benedictis (Ancona)

Fulvio Esposito (Napoli)

Mario La Rosa (Catania)

Massimo Landi (Torino)

Gianluigi Marseglia (Pavia)

Fabio Midulla (Roma)

Luigi Nespoli (Varese)

Giorgio L. Piacentini (Verona)

Giovanni A. Rossi (Genova)

Giancarlo Tancredi (Roma)

Marcello Verini (Chieti)

Editore

Giannini Editore

Via Cisterna dell' Olio 6b

80134 Napoli

e-mail: editore@gianninispa.it

www.gianninieditore.it

Coordinamento Editoriale

Center Comunicazioni e Congressi Srl

e-mail: info@centercongressi.com

Napoli

Realizzazione Editoriale e

Stampa

Officine Grafiche F. Giannini & Figli

SpA

Napoli

© Copyright 2018 by SIMRI

Finito di stampare nel mese di novembre 2018

La genetica molecolare: casi clinici per imparare

Molecular genetics: learning through case reports

Federica Porcaro¹, Carlo De Pieri²

¹ UOC di Broncopneumologia, Dipartimento Pediatrico Universitario Ospedaliero, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

² Clinica Pediatrica, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Udine, Udine.

Corrispondenza: Federica Porcaro; **email:** federica.porcaro@opbg.net, carlodepieri@gmail.com

Riassunto Sebbene il percorso diagnostico delle malattie trovi il suo principale fondamento nella raccolta dei dati anamnestici e nella valutazione clinica del paziente, esso si completa mediante l'esecuzione di indagini più dettagliate, specie nell'inquadramento delle malattie su base genetica.

La genetica molecolare definisce quella branca della medicina che si occupa dello studio della struttura e del funzionamento dei geni a livello molecolare. Tale settore scientifico, oramai in rapida evoluzione, si avvantaggia dello sviluppo di tecnologie sempre più sensibili ed affidabili, oltre che della conoscenza sempre più approfondita della struttura, organizzazione e funzione degli acidi nucleici. Descriviamo, di seguito, il caso di una bambina di 5 mesi, giunta alla nostra osservazione per un quadro clinico caratterizzato da difficoltà nell'alimentazione, scarso accrescimento staturo-ponderale e tachipnea. Al termine dell'iter diagnostico, è stata posta diagnosi di proteinosi alveolare, supportata dalla rilevazione di una mutazione specifica a carico del gene *MARS* (*methionyl transfer RNA synthetase*).

Parole chiave: malattie genetiche, marcatore molecolare, analisi molecolare, citogenetica molecolare, proteinosi alveolare, gene *MARS*.

Summary: Although the collection of clinical history and physical examination of a patient is very important in the diagnostic workup of diseases, the execution of more detailed investigations is necessary especially in the definition of genetic diseases.

Molecular genetics is the branch of medicine that assesses structure, organization and function of genes at a molecular level. Its rapid evolution is due to the development of sensitive and reliable technologies, as well as an increasingly improved knowledge of structure, organization and function of nucleic acids.

We herein describe the case of a 5-month-old child with feeding difficulties, failure to thrive and tachypnoea, who underwent multiple diagnostic procedures and was diagnosed as having alveolar proteinosis, confirmed by the detection of a mutation in *MARS* (*methionyl transfer RNA synthetase*) gene.

Keywords: genetic diseases, molecular marker, molecular analysis, molecular cytogenetics, alveolar proteinosis, *MARS* gene.

INTRODUZIONE

La raccolta dei dati anamnestici e l'accurata valutazione clinica ricoprono un ruolo di primaria importanza nel percorso diagnostico delle malattie genetiche, il cui completamento, spesso, culmina nell'esecuzione dei test genetici. Per test genetico s'intende l'analisi di DNA, RNA, cromosomi, proteine, metaboliti o altri prodotti genici volta ad identificare cariotipi, genotipi, mutazioni o fenotipi correlati o meno con patologie ereditabili umane (1).

Allo stato attuale sono disponibili indagini biochimiche, molecolari o citogenetiche in grado di definire il difetto genetico e, quindi, di confermare il sospetto clinico in epoca pre- e post-natale, oltre che in fase pre-sintomatica in quei soggetti considerati a rischio.

Tuttavia, i campi di applicazione della *genetica* e della *genomica* sono ben più ampi, in quanto in grado di fornire utili informazioni in merito alla variabilità dell'espressione genica, alle relazioni evuzionistiche tra l'uomo e gli altri organismi viventi, all'identificazione delle correlazioni tra l'informazione contenuta nel genoma e la suscettibilità/predisposizione alle malattie e alla soggettività della risposta clinica alla somministrazione di farmaci (*farmacogenomica*). Ne deriva, dunque, il sempre più crescente interesse della comunità scientifica nei confronti

di tali metodiche diagnostiche e del loro ruolo nella pratica clinica negli ultimi decenni. In relazione alla malattia genetica sospettata, gli studi di laboratorio disponibili includono le seguenti tipologie di indagini: biochimiche (dosaggi enzimatici), molecolari (analisi del DNA e dell'RNA), citogenetiche (analisi dei cromosomi) (2). Poiché la trattazione delle indagini biochimiche esula dallo scopo della presente trattazione, di seguito saranno esaminate le principali tecniche di diagnostica molecolare e di citogenetica molecolare. Le analisi di diagnostica molecolare si servono di tecniche sofisticate che richiedono l'utilizzo di particolari enzimi (enzimi di restrizione, retro-trascrizione e amplificazione), necessari per l'analisi degli acidi nucleici (DNA e RNA), previa estrazione cellulare. Esse consentono di definire le basi biologiche di diverse malattie, nonché di identificare specifiche sequenze/geni tramite l'impiego di sonde molecolari.

Le analisi di citogenetica molecolare necessitano, invece, dell'utilizzo di sostanze coloranti al fine di rilevare regioni cromosomiche a diverse intensità di colorazione su colture di linfociti prelevati da sangue periferico. I cromosomi così bandeggiati, suddivisi e classificati secondo una nomenclatura standardizzata, permettono l'identificazione di alterazioni numeriche e strutturali delle singole unità del genoma.

Poiché le suddette indagini sono in grado di fornire informazioni diagnostiche, terapeutiche e prognostiche, esse trovano oramai impiego routinario nella diagnostica dei disordini ereditari e delle malattie associate a mutazioni somatiche.

PRINCIPALI TECNICHE DI DIAGNOSTICA MOLECOLARE

L'analisi del genoma mediante marcatori molecolari è in grado di rilevare i polimorfismi tra individui diversi appartenenti alla stessa specie. Le differenze rilevate a livello di una specifica sequenza nucleotidica del DNA costituiscono un insieme di marcatori genetici con elevate potenzialità discriminanti e rappresentano un valido sistema di analisi comparativa dei genomi. L'identificazione e l'isolamento di numerosi enzimi (enzimi di restrizione e polimerasi) in grado di rilevare il marcatore molecolare tramite la digestione degli acidi nucleici, nonché la messa a punto di precise tecniche elettroforetiche di separazione (*Southern Blot e Northern Blot*) ed amplificazione degli acidi nucleici (*Polymerase Chain Reaction, PCR*), hanno reso possibile l'analisi della struttura e della funzione del materiale genetico (3).

Si definisce marcatore molecolare quel *locus* genomico rilevabile con sonde o inneschi specifici e che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in maniera caratteristica ed inequivocabile il tratto cromosomico con cui si identifica. Pertanto, i marcatori molecolari si basano direttamente sulla rilevazione di differenze nella sequenza nucleotidica del DNA che costituiscono il patrimonio ereditario di ciascun individuo. Tali polimorfismi possono essere la conseguenza di mutazioni quali inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni o mutazioni puntiformi.

Attualmente sono disponibili diversi marcatori molecolari, che trovano largo impiego quale strumento di indagine estremamente efficace ed affidabile (3).

I sistemi molecolari per l'analisi del polimorfismo genomico si differenziano per:- il tipo di sequenze analizzate;

- il tipo di *locus* analizzato (marcatore multi-*locus*: analisi simultanea di molti *loci* genomici che implicano l'amplificazione di tratti cromosomici casuali con inneschi oligonucleotidici a sequenza nota arbitraria; marcatore singolo-*locus*: ibridazione o amplificazione di tratti cromosomici a sequenza nota mediante l'utilizzo di sonde o inneschi specifici per determinati *loci*);

- il tipo di tecnologia impiegata nei processi di separazione ed amplificazione degli acidi nucleici (tecniche d'ibridazione *Southern blot*, tecniche d'ibridazione *Northern blot* e amplificazione polimerasica a catena).

La disponibilità degli acidi nucleici rappresenta una premessa necessaria per qualsiasi procedura di diagnostica molecolare (3).

Il procedimento di estrazione del DNA richiede anzitutto la disgregazione della membrana cellulare (plasmatica e nucleare) mediante l'utilizzo di sostanze detergenti, coadiuvate da ausili meccanici.

Il lisato cellulare viene poi trattato con proteasi al fine di inattivare le proteine contaminanti la preparazione degli acidi nucleici. L'incubazione con proteasi ed enzimi in grado di degradare specificatamente l'RNA (RNasi) permette l'isolamento del DNA, che successivamente viene estratto utilizzando fenolo e cloroformio. Il DNA in fase acquosa – precipitato con sodio acetato ed etanolo assoluto, visibile sotto forma di un “gomitolo” biancastro – è recuperato dopo centrifugazione. Le tecniche *Southern blot* e *Northern blot* rappresentano due metodologie di comune impiego nella genetica molecolare per l'elettroforesi e l'ibridazione rispettivamente del DNA e dell'RNA (3). Le informazioni derivanti dall'utilizzo della tecnica *Southern blot* includono: 1) la rilevazione della presenza o assenza di uno specifico frammento di DNA; 2) la rilevazione della posizione dei siti di restrizione attraverso la stima delle dimensioni dei frammenti di DNA; 3) la valutazione del numero di copie di un determinato frammento di DNA attraverso la comparazione con un campione normale.

La procedura, che richiede primariamente l'isolamento del DNA genomico attraverso il procedimento di estrazione sopra descritto, si avvale di enzimi di restrizione che digeriscono il DNA in siti specifici (siti di restrizione) ad una temperatura costante (37°C). I frammenti di DNA così ottenuti sono poi sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio e successiva colorazione con bromuro di etidio (molecola intercalante gli acidi nucleici). I frammenti di DNA così ottenuti, il cui peso molecolare è determinato per confronto con frammenti di DNA con peso molecolare noto, sono trasferiti su filtro di nitrocellulosa a cui è aggiunta una sonda radioattiva che ibriderà qualsiasi frammento di DNA complementare. Tale metodica permette di identificare con precisione la localizzazione dei siti di riconoscimento degli enzimi utilizzati, ottenendo dunque una mappa di restrizione. Una metodica simile alla precedente e sviluppata per l'analisi dell'RNA è la tecnica *Northern blot*. L'informazione derivante dall'utilizzo di questa metodologia consiste nella definizione dell'espressione genica attraverso la rilevazione delle dimensioni dell'mRNA codificato da un gene. In tal caso, le molecole di RNA estratte dalle cellule sono separate in relazione alle loro dimensioni su gel di agarosio e trasferite su filtro di nitrocellulosa. Dopo l'ibridazione con una sonda marcata e l'uso della tecnica di rilevazione appropriata, le bande indicheranno la localizzazione delle specie di RNA complementari con la sonda.

La scoperta della reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) da parte di Muller et al. (1986) ha di fatto consentito la messa a punto di nuovi marcatori molecolari (4).

Tale metodica permette la sintesi ripetuta *in vitro* e per via enzimatica di uno o più specifici segmenti di DNA localizzati tra due sequenze nucleotidiche note.

Dopo una serie di fasi di denaturazione del DNA, ibridazione con gli inneschi (o *primer*) e polimerizzazione dei nuovi filamenti, è possibile ottenere la produzione di un numero elevato di copie di specifiche sequenze di DNA. La PCR prevede l'utilizzo di un termociclatore in grado di realizzare ripetuti cicli termici. All'inizio di ogni ciclo termico il DNA genomico è sottoposto a denaturazione mediante riscaldamento (93-95°C). In seguito, in ragione delle caratteristiche termodinamiche dei *primer* impiegati, si procede al rapido raffreddamento (37-55°C) della reazione che permette l'ibridazione dei *primer* con le sequenze complementari del DNA stampo. Al termine della reazione, seguirà l'adeguamento della temperatura al valore necessario perché l'enzima DNA polimerasi possa catalizzare la sintesi di nuovi filamenti di DNA complementari a quello stampo (72°C). La reazione di amplificazione degli acidi nucleici sostenuta dalla DNA polimerasi rappresenta la chiave di volta del sequenziamento Sanger, tecnica di genetica molecolare utilizzata per lo svolgimento del caso clinico descritto di seguito. In biologia molecolare, si definisce sequenziamento il processo volto alla determinazione dell'esatta sequenza di basi che prendono parte alla costituzione del frammento di DNA in analisi. Sino ad ora la metodica maggiormente utilizzata – anche definita “metodo della terminazione della catena” – si basa su una strategia enzimatica sviluppata da Frederick Sanger (1977). Il sequenziamento Sanger è definito “enzimatico” poiché prevede l'utilizzo di un enzima, la DNA polimerasi, che, iniziando da un *primer* complementare alla regione del DNA stampo, utilizza i quattro deossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) per allungare la catena (3). Nella reazione di sequenziamento, oltre ai deossinucleotidi normali, vengono impiegati nucleotidi modificati (di-deossitri-fosfato,

ddNTPs) per interrompere la reazione di sintesi in posizioni specifiche (metodo della terminazione della catena). I ddNTPs sono molecole artificiali corrispondenti ai nucleotidi naturali, che si differenziano per l'assenza del gruppo OH sul carbonio 3' dello zucchero. Tale modifica della struttura nucleotidica impedisce la formazione di legami fosfodiesterici (*DNA chain terminator*), comportando la terminazione della reazione di allungamento della catena nucleotidica.

Il campione di DNA da sequenziare viene, dunque, suddiviso in quattro reazioni separate, ognuna delle quali contiene, oltre al DNA stampo, un frammento corto di DNA a singolo filamento e complementare all'estremità 3' del DNA (*primer*), la DNA polimerasi e i quattro deossinucleotidi.

A ciascuna di queste reazioni viene, tuttavia, aggiunto soltanto uno dei quattro ddNTPs marcati con isotopo radiattivo (o con fluorocromi) in quantità stechiometricamente inferiore ai deossinucleotidi per permettere un'elongazione del filamento sufficiente per l'analisi.

L'incorporazione di un ddNTP lungo il filamento di DNA in estensione ne causa la terminazione prima del raggiungimento della fine della sequenza di DNA stampo.

Tale reazione dà origine ad una serie di frammenti di DNA di lunghezza variabile, interrotti in corrispondenza dell'incorporazione del ddNTP casualmente integrato dalla polimerasi. In seguito, le quattro reazioni saranno fatte correre su gel di poli-acrilammide, dove i frammenti, che potranno differire anche di una singola base, saranno separati in relazione alla loro lunghezza. I frammenti saranno poi visualizzati su lastra fotografica come bande scure, la cui sequenza sarà letta dal basso verso l'alto. Oggigiorno, tuttavia, sono impiegati dei sequenziatori automatici in grado di usare tutti i ddNTPs, marcati con quattro coloranti fluorescenti differenti (fluorocromi), all'interno di un'unica reazione. Ogni filamento di DNA emetterà una luce di colore diverso in base al ddNTP con il quale terminerà; le fluorescenze rilevate tramite un sensore posto alla fine del capillare delinearanno delle curve di assorbimento (ciascuna per ogni ddNTP), chiamate ferogrammi.

PRINCIPALI TECNICHE DI CITOGENETICA MOLECOLARE

L'analisi citogenetica convenzionale include lo studio del cariotipo (insieme dei cromosomi metafasici), l'ibridazione *in situ* di fluorescenza (*Fluorescence In Situ Hybridization, FISH*) e l'ibridazione genomica comparativa dell'*array* (*array Comparative Genomic Hybridization, aCGH*). Tali metodiche prevedono lo studio microscopico dei 23 cromosomi umani, consentendo l'identificazione di aneuploidie, oltre che di eventuali aberrazioni cromosomiche ricorrenti, siano esse caratterizzate dalla perdita netta o dall'aggiunta di materiale genetico (traslocazioni definite "sbilanciate") o dall'assenza di tali condizioni (traslocazioni "bilanciate").

Tuttavia, soltanto le ultime due metodiche sono propriamente considerate quali tecniche di citogenetica molecolare, poiché in grado di rilevare anomalie che sono al di sotto della risoluzione dell'analisi cromosomica. L'analisi della morfologia e del bandeggio dei singoli cromosomi deriva dalla possibilità di utilizzare specifiche sonde oligonucleotidiche di DNA ad alta omologia. Tali sonde, marcate con colorazione citochimica (colorazione *Giemsa* o *reverse*) o fluorescente (colorazione con quinacrina), permettono l'identificazione di determinate sequenze bersaglio su cromosomi metafasici o interfaseici. Tuttavia, l'impiego delle suddette metodiche era inizialmente vincolato al numero minimo e standardizzato di 20 metafasi. In ragione della variabilità dell'indice di proliferazione cellulare e dunque dell'impossibilità di ottenere il numero minimo di metafasi richiesto per l'esecuzione dell'analisi – data anche la presenza di anomalie citogenetiche ricorrenti – in molti laboratori si è proceduto ad impiegare tecniche in grado di sfruttare il grande numero di interfasi per stimare egualmente alcune possibili anomalie.

La FISH rappresenta una tecnica per l'approfondimento e la verifica diagnostica del cariotipo (5). Una sonda fluorescente – costituita di una specifica sequenza di DNA realizzata *in vitro* con l'inclusione di nucleotidi fluorescenti – viene fatta ibridare con i cromosomi parzialmente

denaturati. Dopo la separazione delle eliche, la sonda si appaierà solo sul tratto di cromosoma contenente la sequenza di DNA complementare, che dunque emetterà un segnale fluorescente. Alterazioni nella posizione del segnale rispetto a quella attesa in un corredo cromosomico normale indicheranno un possibile ri-arrangiamento.

La FISH è generalmente utilizzata per “indagini mirate”, basate su una specifica indicazione clinica. Ciò limita l'applicazione di questa tecnica, poiché in molti casi i fenotipi patologici non sono riconducibili a sindromi note. La CGH consente, invece, il rilevamento di amplificazioni e delezioni di regioni ancora più piccole di DNA all'interno dei cromosomi (6).

La tecnica prevede il confronto del contenuto genomico (DNA) di un paziente con uno o più individui di controllo considerati normali.

Durante il processo analitico i DNA vengono marcati con due differenti sostanze fluorescenti; si è soliti utilizzare il fluorocromo rosso per il DNA da testare ed il fluorocromo verde per il DNA di controllo. I due DNA marcati sono mescolati in parti uguali e, dopo un'opportuna purificazione, ibridati sulla piattaforma *array*. Dopo opportuni lavaggi post-ibridazione, si procede alla rilevazione dell'intensità dei segnali fluorescenti emessi dalle sonde. Ogni sonda della piattaforma rappresenta una specifica regione del genoma umano e quanto più è elevato il numero di sonde, tanto maggiore è l'efficacia dell'*array* nell'identificazione delle variazioni del numero di copie.

La misurazione dell'intensità della fluorescenza emessa dai DNA ibridati sull'*array* e la loro comparazione permettono di evidenziare variazioni del numero di copie presenti nel DNA testato.

Attualmente sono disponibili diverse tipologie di piattaforme *array*-CGH: i *BAC*-*arrays* e gli *oligo*-*arrays*. I primi, considerati *arrays* di vecchia generazione, contengono un numero piuttosto limitato di sonde, la cui specificità e il cui potere di risoluzione sono inficiati dalle loro grandi dimensioni (circa 160.000 paia di basi). I secondi, invece, possiedono un numero molto più elevato di sonde, le cui piccole dimensioni (da 20 a 100 basi) garantiscono una maggiore risoluzione ed accuratezza nella definizione delle anomalie del DNA, con elevata specificità.

CASO CLINICO

Lashwana è una bambina di 5 mesi di nazionalità francese, nata a Maiotta, isola facente parte dell'arcipelago Comore nell'Oceano Indiano, e che è giunta alla nostra attenzione per difficoltà nell'alimentazione e arresto della crescita staturale-ponderale. L'esordio dei sintomi risaliva ai primi due mesi di vita, a seguito di un'infezione respiratoria virale accompagnata da rinite e candidosi orale.

La bambina era nata a termine dopo gravidanza normo-decorsa ed il periodo peri- e post-natale era stato regolare e senza menzione di *distress* respiratorio neonatale. Poiché non si registrava l'incremento ponderale atteso nonostante l'ottimizzazione degli apporti calorici tramite la nutrizione enterale, veniva avviato un bilancio eziologico esteso. In particolare, lo studio della funzionalità epatica, renale e tiroidea, il test del sudore e lo screening metabolico (profilo delle acil-carnitine e dosaggio di ammoniemia, alfa-1 anti-tripsina, lattati e CPK) ed immunologico (sottopopolazioni linfocitarie e dosaggio delle immunoglobuline sieriche) erano nella norma.

L'ecocardiogramma mostrava la persistenza di un piccolo difetto interatriale di 3 mm di diametro, non emodinamicamente significativo, mentre l'ecografia addominale evidenziava un'epatomegalia omogenea. Al fine di escludere un quadro di malassorbimento intestinale, veniva eseguita l'esofago-gastro-duodeno-scopia con biopsie multiple, che tuttavia non risultavano diagnostiche.

Dopo circa due mesi la bambina era nuovamente rivalutata in ragione della persistenza dello scarso accrescimento. L'esame clinico mostrava la presenza di tachipnea (90-100 atti respiratori/minuto) e l'esame radiografico del torace evidenziava un quadro compatibile con interstiziopatia polmonare (figura 1), in seguito confermata dalla tomografia computerizzata (TC) (figura 2).

La broncoscopia flessibile con lavaggio bronco-alveolare (BAL) evidenziava la presenza di abbondante materiale lipo-proteinaceo (figura 3).

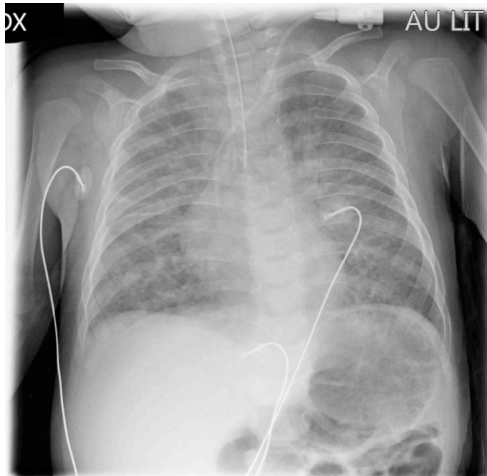


Fig. 1: Radiografia del torace all'esordio della sintomatologia. Quadro compatibile con interstiziopatia.

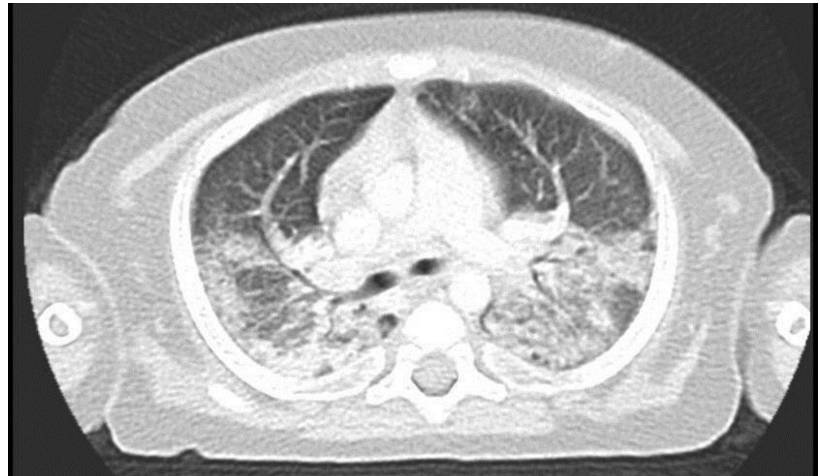


Fig. 2: Tomografia computerizzata all'esordio. È possibile notare la concentrazione maggiore delle lesioni nelle aree declivi del polmone

Dalla raccolta anamnestica familiare emergeva una storia di morte di due fratelli materni in epoca neonatale per cause non meglio precisate. Sebbene il BAL fosse di per sé diagnostico per proteinosi alveolare, unitamente all'origine geografica dei genitori e della bambina ed alla storia familiare suggestiva, si poneva tuttavia l'indicazione all'esecuzione di indagini genetiche tramite tecnica di sequenziamento Sanger, che permetteva l'identificazione di due mutazioni – c.1177G>A (p.Ala393Thr) e c1700C>T (p.Ser567Leu) – in omozigosi sul gene MARS. I genitori, anch'essi sottoposti ad approfondimenti genetici, risultavano portatori in eterozigosi delle stesse mutazioni.

DISCUSSIONE

La proteinosi alveolare è una malattia caratterizzata dall'accumulo di materiale lipoproteico all'interno degli alveoli (7). Il disordine, descritto tanto nella popolazione pediatrica quanto negli adulti, può presentare diverse cause eziopatogenetiche.

Sebbene le forme diagnosticate nel paziente adulto siano più frequentemente sostenute da reazioni autoimmunitarie caratterizzate dalla produzione di anticorpi contro il recettore per il GM-CSF (*granulocyte monocyte - colony stimulating factor*), le forme geneticamente determinate sono di maggiore riscontro in età pediatrica (8).

L'avanzamento delle tecniche di diagnostica molecolare ha permesso una migliore definizione genotipica della malattia attraverso la rilevazione di mutazioni a carico dei geni codificanti le proteine coinvolte nella sintesi e nel metabolismo del surfactante.

In ragione della molteplicità dei geni coinvolti, l'espressività fenotipica e dunque la prognosi appaiono alquanto variabili. Le forme più note vedono il coinvolgimento dei geni che codificano le proteine B e C del surfactante (geni *SFTPB* e *SFTPC*) (9, 10) o le proteine coinvolte nel metabolismo dello stesso (gene *ABCA3* *adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette protein family*) (11). Tuttavia, altri difetti genetici possono alterare i processi di trascrizione delle proteine del surfactante (mutazioni del gene *TTF-1*, *Thyroid transcription factor-1*) (12), di trasporto degli aminoacidi cationici implicati nella sua sintesi (mutazioni del gene *SLC7A7* responsabili della *lysine protein intolerance*) (13) e di sintesi delle catene α e β c del recettore per il GM-CSF (14).



Fig. 3: Liquido di lavaggio bronco-alveolare ottenuto da lavaggio terapeutico del polmone (*whole lung lavage*)

Quest'ultimo rappresenta, inoltre, il bersaglio degli anticorpi prodotti nelle forme autoimmuni tipiche dell'adulto, caratterizzate da un'attività deficitaria del macrofago alveolare coinvolto nel metabolismo e nel riciclo cellulare del surfactante polmonare.

Diversamente, le forme secondarie risultano più spesso associate a linfoma ed altre malattie linfoproliferative, infezioni (*Nocardia* o *M. tuberculosis*) o esposizione ad agenti chimici irritanti (15). Il caso clinico sopra riportato, descrive l'eziologia genetica della malattia come dimostrato dalla mutazione rilevata a carico del gene *MARS*, codificante la tRNA-metionil-sintetasi (16).

La trasmissione della malattia, per la quale è descritta una particolare distribuzione geografica poiché peculiare dell'Isola della Réunion, presuppone l'effetto fondatore e la recessività trasmissiva. L'analisi di 34 casi osservati in un arco temporale di 42 anni ha permesso di precisare le caratteristiche cliniche, biologiche, radiologiche ed evolutive di questa forma particolare di proteinosi alveolare (17). Le manifestazioni respiratorie esordiscono in epoca precoce, generalmente entro i primi 3 mesi di vita, e sono accompagnati da arresto della crescita staturale-ponderale in circa il 90% dei casi. L'iper-transaminasemia, espressiva del coinvolgimento epatico, risulta altrettanto frequente, così come il quadro di flogosi sistemica, testimoniata dall'incremento dei livelli di proteina C reattiva, dall'anemia sideropenica, dalla trombocitosi e dall'ipergammaglobulinemia (18). In tali pazienti la TC del torace senza mezzo di contrasto mostra un quadro di aspetto a vetro smerigliato, riempimento alveolare e *crazy paving* prevalentemente localizzato nelle aree declivi, con un doppio gradiente antero-posteriore e supero-inferiore (18).

Il lavaggio bronco-alveolare assolve alla duplice funzione diagnostica e terapeutica poiché in grado di offrire dei miglioramenti clinici consistenti, quali lo svezzamento dall'ossigeno e la ripresa della crescita ponderale nel breve e medio termine. Tuttavia, tale miglioramento clinico non influisce sulla sopravvivenza globale, poiché il 67% dei casi evolve verso un quadro di fibrosi polmonare.

In tali casi prevale l'aspetto radiologico, caratterizzato da immagini reticolari, microcisti sub-pleuriche, ovvero lungo il decorso dei setti e gli assi bronco-vascolari, che delineano il quadro radiologico classico definito "a nido d'ape", con associate bronchiectasie da trazione (18).

Sebbene i meccanismi sottostanti l'evoluzione fibrotica non siano ancora noti, la prognosi rimane severa in circa il 60% dei casi, poiché il decesso può avvenire entro i 2 anni di vita ovvero nelle epoche successive in relazione alla severità della fibrosi polmonare (18).

Sebbene il trapianto polmonare possa rappresentare un'opzione terapeutica, in letteratura sono stati descritti soltanto 4 casi per i quali si è tentato il trapianto polmonare: 3 di essi sono deceduti nell'immediato periodo peri-operatorio, mentre un paziente è andato incontro ad *exitus* dopo circa due anni dal trapianto probabilmente a seguito della ripresa della malattia sul polmone impiantato (18).

CONCLUSIONI

Le tecniche di biologia molecolare costituiscono il principale ambito di applicazione dei risultati della ricerca di base svolta in campo biologico-molecolare e biomedico.

Il sequenziamento del DNA è oggi una metodica routinaria grazie alla quale è possibile sequenziare migliaia di nucleotidi. Sequenze complete per migliaia di geni di microrganismi, piante e animali (incluso l'uomo) sono al momento disponibili e banche dati informatiche sono state messe a punto per conservare ed analizzare le informazioni di sequenza. Sempre più frequentemente il sequenziamento è stato, altresì, applicato non soltanto sui singoli geni, ma su interi genomi. Ne deriva, pertanto, il sempre più crescente interesse della comunità scientifica nei confronti di quelle tecniche che permettono di ottenere una conoscenza dettagliata del genoma umano. Tali conoscenze permettono certamente una migliore definizione diagnostica di entità nosologiche rare, nonché la loro presa in carico e la formulazione prognostica anche in termini di *counselling* genetico per le famiglie. Oltre a ciò, potrebbero consentire – mediante la tecnologia del DNA ricombinate – di modificare determinati geni con il preciso intento di correggere le malattie intervenendo sui tessuti malfunzionanti.

Ringraziamenti: Si ringrazia l'equipe medica del reparto di Pneumologia ed Allergologia dell'ospedale pediatrico Necker Enfant Malades dove il caso clinico è stato osservato ed in particolare il dottor David Drummond per la disponibilità. Si ringrazia inoltre l'ERS *Clinical Training Fellowship* per il supporto.

GLOSSARIO

Genetica: scienza che studia i singoli geni.

Genomica: disciplina che esamina l'insieme dei geni nell'ambito di uno specifico genoma.

Farmacogenomica: determinazione ed analisi del DNA e dei suoi prodotti allo scopo di correlare queste informazioni con la risposta (cellulare, tissutale ed individuale) ad un farmaco.

Polimorfismo: differenza in regioni omologhe tra individui diversi appartenenti alla stessa specie. Per convenzione, si considerano polimorfismi genetici solo le forme che si presentano con una frequenza maggiore dell'1%. *Locus genomico*: frammento di DNA compreso tra due regioni oligonucleotidiche note.

Inserzione: mutazione che si caratterizza per l'inclusione di nucleotidi aggiuntivi ad un certo livello della sequenza del DNA.

Delezione: mutazione che si caratterizza per la perdita di una porzione di genoma di dimensioni variabili (singolo nucleotide, uno o più geni oppure segmento di cromosoma).

Traslocazione: aberrazione cromosomica strutturale che consiste nel trasferimento di un segmento di cromosoma ad un cromosoma diverso.

Duplicazione: aberrazione cromosomica consistente nella duplicazione di un segmento di un cromosoma, che quindi è presente due volte all'interno del genoma aploide.

Mutazione puntiforme: mutazione consistente in un'alterazione (sostituzione, delezione o inserzione) di una singola coppia di basi del DNA.

Primer: corta sequenza nucleotidica sintetizzata in laboratorio, complementare al DNA da amplificare.

Aneuploidia: alterazione cromosomica numerica.

Metafase: periodo del ciclo cellulare in cui i cromosomi si distribuiscono al centro della cellula formando la piastra equatoriale.

Interfase: periodo del ciclo cellulare che intercorre tra una mitosi e la successiva.

Array: supporto di vetro o plastica la cui superficie è coperta da frammenti di DNA comunemente chiamati "sonde".

BIBLIOGRAFIA

- (1) Harper PS. *What do we mean by genetic testing?* J Med Genet 1997; 34: 749-752.
- (2) Strachan T, Read AP. *Human molecular genetics*. 4th ed. ed. United States: New York : Garland Science/Taylor & Francis Group 2011; 569-604.
- (3) Becker WM KL, Hardin J. *Il Mondo Della Cellula*. Napoli: Edises 2007; 9: 171-201
- (4) Templeton NS. *The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 1992; 1: 58-72. Epub
- (5) van Ommen GJ, Breuning MH, Raap AK. *FISH in genome research and molecular diagnostics*. Current opinion in genetics & development. 1995; 5: 304-308.
- (6) Aradhya S, Cherry AM. *Array-based comparative genomic hybridization: clinical contexts for targeted and whole-genome designs*. Genetics in medicine. Am College MedGen J 2007; 9: 553-559.
- (7) Hamvas A, Cole FS, Nogee LM. *Genetic disorders of surfactant proteins*. Neonatol. 2007; 91: 311-317.
- (8) Suzuki T, Trapnell BC. *Pulmonary Alveolar Proteinosis Syndrome*. Clinics in chest medicine. 2016; 37: 431-440.
- (9) Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, et al. *Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis*. New Engl Med J 1993; 328: 406-410.10. Thouvenin G, Abou Taam R, Flamein F, et al. *Characteristics of disorders associated with genetic mutations of surfactant protein C*. Arch Dis Child 2010; 95 :449-454.
- (10) Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, et al. *ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency*. New Engl Med J 2004; 350: 1296-1303.
- (11) Hamvas A, Deterding RR, Wert SE, et al. *Heterogeneous pulmonary phenotypes associated with mutations in the thyroid transcription factor gene NKX2-1*. Chest 2013; 144: 794-804.
- (12) Santamaria F, Brancaccio G, Parenti G, et al. *Recurrent fatal pulmonary alveolar proteinosis after heart-lung transplantation in a child with lysinuric protein intolerance*. J Ped 2004; 145: 268-272.
- (13) Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, et al. *Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression*. Clin Investigat J 1997; 100: 2211-2217.
- (14) Wang BM, Stern EJ, Schmidt RA, et al. *Diagnosing pulmonary alveolar proteinosis. A review and an update*. Chest 1997; 111: 460-466.
- (15) Hadchouel A, Wieland T, Griese M, et al. *Biallelic Mutations of Methionyl-tRNA Synthetase Cause a Specific Type of Pulmonary Alveolar Proteinosis Prevalent on Reunion Island*. Am J Hum Gen 2015; 96: 826-831.
- (16) Enaud L, Hadchouel A, Coulomb A, et al. *Pulmonary alveolar proteinosis in children on La Reunion Island: a new inherited disorder?* Orph J Rare Dis J 2014; 9: 85.
- (17) de Blic JDC. *Pneumol. Pédiatriq* 2018; 1: 505.