

## STRATEGIE TERAPEUTICHE PER I DISORDINI EREDITARI

### APROCCI DI TERAPIA GENICA

- Cellule staminali somatiche
- Trasferimento genico
- Modificazioni dell'RNA
- Cellule staminali embrionali (in Italia è vietata)

Gli approcci che riguardano l'utilizzo di un gene comprendono:

1. **Gene addiction** → prevede l'utilizzo di *vettori virali*; consiste nell'introduzione dall'esterno di un gene che funziona a cui viene delegato il compito di sostituire un gene che invece non è funzionante → *creo cellule transgeniche*
2. **Gene correction** → usa la ricombinazione omologa. Esistono 2 tecniche differenti:
  - a. Il virus si integra nel genoma umano ed il suo gene viene continuamente espresso ma questo può portare a dei problemi
  - b. Si sostituisce il segmento di gene malato con un segmento sano e si applica dunque una correzione in situ.

### MALATTIE GENICHE

- Esistono 25.000 geni
- 1.800 sono stati attualmente identificati come causa di *disordini ereditari*.
- Le proteine sono in realtà di più dei geni (circa 100.000) perché la maggior parte delle volte si realizza uno "*splicing alternativo*" responsabile della maggior parte di questa discrepanza numerica. Altre cause consistono nella possibilità che uno stesso gene abbia diversi promotori o punti di termine diversi a livello delle code di poliA.
- La *G correction* o la *compensation* o anche tutti gli altri approcci servono solo per disordini ereditari miogenici.

### DISORDINI MONOGENICI

- Talassemie
- Emofilia
- Fibrosi cistica
- SCID
- Ipercolesterloemia familiare
- Huntington etc

Le strategie che si mettono in atto attualmente sono :

- Manipolazione metabolica ad es. fenilchetonuria (fenilalanina)

### GENE TRANSFER

- EX VIVO
- IN VIVO

EX VIVO → limitata ai disordini in cui posso individuare le cellule interessate dalla malattia; le posso *prelevare*, *correggere* e *rimettere* nel paziente.

Es. trasferimento del fattore VIII ai fibroblasti autologhi per trattare l'emofilia A. I fibroblasti sono risultati capaci di esprimere il fattore VIII (nonostante la normale produzione sia epatica); queste cellule vengono impiantate nell'omento.

IN VIVO → si somministra il vettore contenente il DNA terapeutico o direttamente nell'organo oppure nel torrente sanguigno, e da qui all'organo.

### **PROBLEMI LEGATI AL GENE TRANSFER IN VIVO:**

- ancora non sono state trovate strategie molto valide per la somministrazione e per il mantenimento dell'espressione genica.
- Specificità
- Risposta immunitaria (sorveglianza) che si scatena contro il vettore.

Per superare tali problemi bisogna conoscere:

- Le basi molecolari del disordine
- Il modo di interazione
- Il range di mutazione e la relazione genotipo-fenotipo (infatti qualunque mutazione in un gene può dare un fenotipo diverso da un'altra mutazione nello stesso gene)

Es. talassemia:

- La mutazione nel promotore del gene dà un deficit di produzione della proteina (talassemia  $\beta^+$ )
  - La mutazione determina la comparsa di un codone di stop per cui la proteina può non essere proprio prodotta (talassemia  $\beta^0$ )
- COME DOVE E QUANDO SI MANIFESTA LA MALATTIA
- COME IL FENOTIPO È MODULATO DAI GENI ALTERNATIVI → questo lo si può dire nei topi "knock out, cioè quelli in cui si è andato a distruggere un gene ma questo non ha portato comunque ad un'alterazione se il gene in questione era vicariato da un altro.

### **VETTORI PER IL GENE – TRANSFER**

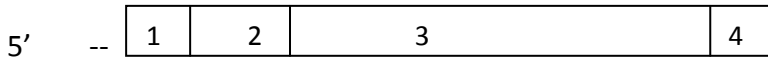
Esistono 5 classi di vettori:

- Plasmidi più lisosomi
- Adenovirus
- Adeno-associati virus
- Retrovirus

- Multi virus

Sono ovviamente modificati → non danno la malattia ma possono provocare una risposta immunitaria.

Il gene tipico utilizzato consiste di:



1. Promotore
2. Introne (non si sa bene a cosa serve ma fa funzionare meglio il gene)
3. Transgene (è un C-DNA cioè un DNA complementare al DNA) → dall'RNA ricavato dalla cellula che lo esprime, possiamo ricavare il DNA corrispondente utilizzando una *trascrittasi inversa*; la differenza con un DNA genomico è che questo ha gli introni mentre quello complementare no) .
4. Sito di poliA (poliadenilazione)

Le barriere che il vettore virale deve superare per il trasferimento genico sono molte:

- Membrana plasmatica
- Citoplasma
- Nucleo (dove può usare l'apparato di trascrizione della cellula)
- Né i **plasmidi** (vettori non virali) né gli **adenovirus** si inseriscono nel genoma della cellula ospite, ma rimangono nel citoplasma → quindi la loro espressione è transiente.
- Gli **adenoassociati**, **retrovirus** e **lentivirus** si integrano nel genoma e danno invece una espressione permanente. Il problema è che non sappiamo DOVE si inseriscono né possiamo indirizzarli; questo può acquisire notevole importanza se parliamo dei protooncogeni; i protooncogeni sono espressi ad un basso livello dalla cellula e quando la cellula stessa lo richiede; questa modalità però può essere alterata dal vettore virale. Questo è successo a 2 pazienti su 3 che hanno ricevuto questa terapia!!! La complicanza più temuta e grave è ovviamente un *tumore*.

PLASMIDE DNA → è una DNA a doppia elica circolare; utilizzando gli enzimi di restrizione e le ligasi, inseriamo il gene, lo coniughiamo con i liposomi così assicuriamo l'ingresso nella cellula. L'espressione dei plasmidi è transitoria.

### TRIAL IN CORSO SU PAZIENTI

VEETTORE	MALATTIA	TRANSGENE	TARGET	RISULTATO
Plasmide + liposomi	Emofilia	Fattore VIII	Fibroblasti	Quando il fattore VIII aumenta la sintomatologia è migliorata

Plasmide + liposomi	Fibrosi cistica	CFTR	Epitelio delle vie aeree con spray	La sintomatologia non è migliorata perché il CFTR non è aumentato
---------------------	-----------------	------	------------------------------------	---

## ADENOVIRUS

Hanno un DNA di 36 kilobasi; si utilizza il sierotipo 5 come primo.

VETTORE	MALATTIA	TRANSGENE	TARGET	RISULTATO
Adenovirus associati sierotipo ?	Fibrosi cistica	CFTR	Epitelio nasale	Sintomatologia non migliorata

## ADENOVIRUS ASSOCIATI

## RETROVIRUS

Hanno una zona LTR all'estremita

VETTORE	MALATTIA	TRANSGENE	TARGET	RISULTATO
Retrovirus ex-vivo	Deficit della adenosina daminasi	Adenosina deaminasi	T-CELLS CD4 cells Midollo osseo	I casi trattati hanno portato a sviluppo di tumori, forse per l'inserimento del vettore davanti al protooncogene

## TERAPIA GENICA PER LA SCID

1. Prelievo di sangue
2. Si isolano i linfociti T che hanno l'antigene CD34
3. Si inserisce il vettore nei linfociti T
4. Si somministra al paziente

## **CONSULENZA GENETICA**

- ATTO DURANTE IL QUALE VENGONO FORNITE TUTTE LE INFORMAZIONI POSSIBILI RIGUARDO IL COMPORTAMENTO PER PROGRAMMARE UNA GRAVIDANZA
- Prevede conoscenze mediche che altre discipline non possiedono
- È una disciplina emergente

È necessario:

- VERIFICARE LA DIAGNOSI: bisogna sapere di che malattia si parla e indagare su vari problemi:
  - ✓ ETEROGENEITA' GENETICA: genotipi diversi possono dar luogo a fenotipi molto simili (es. Distrofia muscolare progressiva)
  - ✓ FENOCOPIE: situazioni cliniche che simulano malattie genetiche, ad esempio la microcefalia che può essere dovuta anche a infezioni o radiazioni in gravidanza, o anche ad utero sedimentario
- STESURA CORRETTA DELL'ALBERO GENEALOGICO. per lo studio della modalità di trasmissione (aut dominante, recessiva, x-linked)
- ILLEGGITTIMITA'. Non paternità biologica, si stima che il 15% di tutti i figli non sono figli del padre di famiglia.

A RICHIEDERE UNA CONSULENZA GENETICA SI VIENE PER :

- PROBLEMATICHE CROMOSOMICHE :
  - ✓ Trisomie: possono riguardare crom. sia sessuali che non (S. DI Down 21 s. di Edwards 18, S. di Patau 13)
  - ✓ Monosomie. l'unica compatibile con la vita è quella che riguarda il crom X
- **S. di Down:**
  1. Traslocazione sbilanciata (il 21 migra su 14-15-21)
  2. Traslocazione libera: i cromosomi sono liberi
  3. Traslocazione bilanciata: non sono fenotipicamente evidenti. tutto il cromosoma migra su un altro, al momento della segregazione può sbilanciarsi
  4. Poi bisogna fare la DD tra trisomia :
    - ✓ libera, il rischio che si ripresenti la sindrome di Down direttamente proporzionale all'età della madre
    - ✓ di traslocazione, il rischio che si ripresenti dipende sia dalla madre che dal padre

in caso di malattie multifattoriali (esiste una correlazione tra genotipo e ambiente, il genotipo agisce come "predisposizione genetica" che da solo non è sufficiente perché si manifesti la malattia.

Ricordiamo che il termine genetico (riconosce una mutazione genetica) è diverso da congenito (presente alla nascita)

Fattori: sono variabili, si usano le tabelle di Speed che tengono conto della:

- ✓ **GRAVITA'** (il rischio di ricorrenza è direttamente proporzionale alla gravità): es. Megacolon congenito: intestino >20 cm → rischio ricorrenza 10-15%  
Intestino <20 cm → " " 5%
- ✓ **SESSO**: es. Stenosi del piloro, alla nascita è più frequente nei M perché hanno una soglia di infezioni > rispetto alle F. In questo caso il sesso che alla nascita è meno colpito è quello che più frequentemente ha figli con malattia
- ✓ **NUMERO DEGLI AFFETTI**:  
nelle multifattoriali il rischio di ricorrenza è direttamente proporzionale al n. degli affetti nelle m. Genetiche il rischio è sempre =50% qualunque sia il n. di affetti.

Ogni nascita di affetto aumenta la probabilità che il successivo sia affetto.

## DIAGNOSI PRENATALE

Le patologie dominanti hanno 2 eccezioni :

- penetranza incompleta
- espressività genetica minima
- anticipazione genetica legata al meccanismo dell'espansione da triplette, questo potrebbe portarci a dire che il pz nn ha ereditato la malattia e quindi è in diritto di procreare con il rischio di concepire un figlio malato.

Indicazioni alla diagnosi prenatale CITOGENETICHE

- MADRI IN Età AVANZATA > 35 anni
- Coppie con precedenti figli affetti da patologie cromosomiche
- Genitori con anomalie cromosomiche bilanciate
- Riscontro Eco di malformazioni fetali (ritardo sviluppo fetale, anomalie liquido amniotico)
- Alterazione parametri biochimici
- Genitori portatori di aneuploidia non associati a infertilità
- Alcune malattie mendeliane
- Gravidanza ottenuta con fecondazione artificiale
- Malattie mendeliane X-linked per le quali è stato riconosciuto un difetto metabolico
- Malattie infettive contratte e riacutizzate in gravidanza

### Parametri biochimici da valutare:

Esiste il **Tritest**:

1.  $\alpha$  fetoproteina (AFP) → per S. Turner, labioschisi, gravidanze multiple
2. estriolo non coniugato (nE3)

### 3. B hCG

esempio:

1. AFP diminuita nel sangue materno, aumentata nel sangue fetale
2. nE3 diminuito
3. BhCG aumentato

} **S. di Down**

A TUTTE LE DONNE > DI 35 ANNI VENE OFFERTA LA POSSIBILITÀ DI DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

ESISTE ANCHE IL BITEST: BhCG E PAPP-A (PROTEINA PLASMATICA ASSOCIATA ALLA GRAVIDANZA)

### **TECNICHE DI PRELIEVO TESSUTI FETALI**

- **AMNIOCENTESI** tra 15-18 settimana, gli amniociti dopo centrifugazione con la fetoemoagglutinina messi in coltura, bisogna indurli alla mitosi, si fa analisi del cariotipo tramite citogenetica, il risultato entro 3 settimane
- **VILLOCENTESI** tra 9 e 11 settimana, si fa analisi citogenetica e molecolare, non devono essere messi in coltura, presentano mitosi spontanee, il risultato entro 48 h

Entrambe le tecniche possono indurre all'aborto o ad anomalie fetali

- **FUNICOLOCENTESI**, prelievo di sangue fetale per malattie ematologiche
- **FETOSCOPIA** (isolamento cell fetali dal sangue materno, bassa specificità, alta sensibilità)

Qualora ci sia incompatibilità Rh sempre profilassi immunoglobulinica

## CARDIOMIOPATIE GENETICHE

Patologia ad impronta genetica che interessano primitivamente il muscolo cardiaco

### CARDIOMIOPATIE IPERTROFICHE:

- caratterizzata da asimmetrica ipertrofia del setto interventricolare (segmento settale subaortico) con prevalentemente coinvolgimento del ventricolo sx .
- Raro nel ventricolo dx
- trasmissione autosomica dominante ad espressione variabile
- sono stati identificati 9 diversi geni che codificano per proteine del sarcomero e più di 110 mutazioni .
  - ✓ il gene identificato per primo è quello della **catena pesante della B miosina** localizzati sul crom 14q11.2.
  - ✓ Altri geni sono quello che codifica per la **troponina** cardiaca
  - ✓ **per A tropo miosina** e
  - ✓ per la **miosina cardiaca legante proteina C** (mutazione più frequente)
- ci sono condizioni di doppia eterozigosi cioè individui che presentano 2 tipi di mutazioni in 2 geni diversi → fenotipo più grave
- etiologia:
  - ✓ alteraz. crescita embrionale
  - ✓ amartoma
  - ✓ aumento catecolamine
  - ✓ malattie metabolismo
  - ✓ sensibilità del cardiomiocita agli ioni calcio, accumulo di calcio → alteraz mitocondriali → ipertrofia cardiomiocita
- aspetto macroscopico:
  - ✓ aumento peso cuore
  - ✓ diminuzione cavità cardiaca
  - ✓ Aumento spessore delle pareti ventricolari e del setto
- Classificazione
  - I classe 10% SIV ANTERIORE
  - II classe 20% SIV ANT E POST
  - III classe 58% PARETE LIBERA DEL VS
  - IV classe 18% PARETE LATERALE, SIV POST E REGIONE APICALE

### CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA OSTRUTTIVA

- IL Setto subaortico mostra come una placca di ispessimento fibroso dell'endocardio
- A livello microscopico c'è un sovvertimento della normale disposizione parallela delle fibre (miocardial disarray)
- Miociti sostituiti da tessuto fibroso

- Disfunzione diastolica ventricolo sx dovuto a 3 fattori:
  - ✓ Diminuita cavità
  - ✓ Aumento stroma connettivale e quindi rigidità pareti
  - ✓ Dismetabolismo per alterato rapporto fibrocell/capillari
- **Clinicamente** si distingue:
  - ✓ Ostruzione a riposo:
  - ✓ Ostruzione latente, provocata da stress fisico o farmacologico, con aumento contrattilità  
vs, ostruzione → riduzione efflusso nell'aorta e nelle coronarie  
→ MORTE IMPROVVISA O SINCOPE  
SE PROVOCATA DA SFORZO →  
dispnea, lipotimia, astenia, angina  
In ortostatismo → PRESINCOPE  
In qualsiasi momento → CARDIOPALMO  
A riposo → ortopnea, dispnea notturna ed edema periferico
- **EO:**
  - ITTO DELLA PUNTA PALPABILE
  - SOFFIO SISTOLICO EIEETTIVO AL PUNTO DI ERB
  - SOFFIO OLOSISTOLICO IRRADIATO ALL'ASCELLA
  - -SDOPPIAMENTO PARADOSSO DEL II TONO
- **DIAGNOSI:**
  - ECG
    - ✓ Q in d3 a VI
    - ✓ Alta R in V1, V2, V3 (ipertrofia settale)
    - ✓ Segni di ipertrofia ventricolare sx di IV grado
    - ✓ Onda T gigante invertita da ipertrofia apicale da v4 a V6
    - ✓ Blocco di branca dx

Inciso:

Ipertrofia all'Ecg esistono 4 gradi e si diagnosticano:

- ECG DINAMICO Holter
- Rx torace non indispensabile, spesso non evidenzia alterazioni
- Eco cardiografica
  - Sia nella monodimensionale che nella bidimensionale
- Studio doppler del flusso mitralico
- Emodinamica: in caso di severo rigurgito mitralico per conoscere la P intracavitaria e pianificare la terapia
- Escludere arteriosclerosi coronariche
- RM nucleare

**Prognosi:** ,può evolvere verso la dilatativa quindi variabile.

*Inciso →Cause di morte improvvisa:*

- ✓ *tachiaritmie ventricolari e sopraventricolari*
- ✓ *bradi aritmie*
- ✓ *disfunzione diastolica*
- ✓ *ipotensione indotta da sforzo fisico*

**Fattori prognostici:**

- ✓ Età giovanile
  - ✓ Familiarità per mi
  - ✓ Forme ostruttive
  - ✓ ECg con tachiaritmie entro 24 h
  - ✓ Sincope e/o lipotimie
  - ✓ Scopenso cardiaco
  - ✓ Fibrillazione atriale
  - ✓ Insorgenza età pediatrica
  - ✓ Gene mutato (mutazione 453,403 prognosi infausta)
- **Terapia:** B bloccanti ,Ca antagonisti,farmaci per attenuare la disfunzione diastolica,trapianto

## **CARDIOMIOPATIA DILATATIVA**

E' caratterizzata da una ridotta funzione sistolica del ventricolo sx o di entrambi associata a dilatazione delle camere

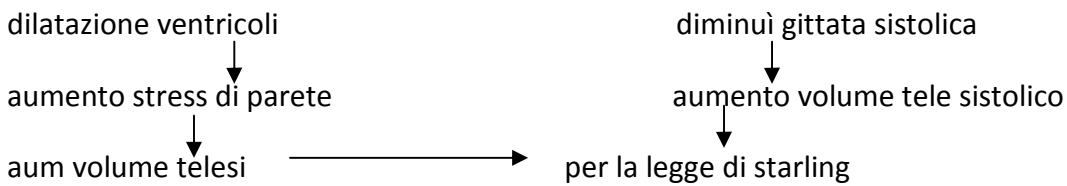
**Macroscopicamente:**

cuore ingrossato,aspetto globoso a livello degli anelli valvolari c'è dilatazione ,peso superiore del 50-100% il normale,c'è rallentamento del flusso sanguigno con formazione di trombi che causano ostruzione a valle della loro sede

**Microscopicamente**

- Ispessimento fibrotico endocardico normalmente focale e dopo fibrosi diffusa  
Infiltrati linfomonocitari  
Presenza di tessuto interstiziale ispessito per la presenza di fibrosi  
Miociti con caratteristici nuclei ipertrofici
- Fisiopatologia:  
corrisponde ad un insufficienza cardiaca

diminuzione contrattilità miocardio



- meccanismi neuroormonali:  
aumento catecolamine  
sono cardiotossiche quindi danno miociti, e SRA determina iperplasia, questo causa diminuzione contrattilità
- **clinica** : sintomi 'esordio legati ad una diminuzione della contrattilità del vs:  
facile stancabilità  
dispnea da sforzo  
astenia generalizzata
- il 75-85% dei pz è in classe NYha III-IV
- **EO** :  
congestione venosa  
rattori, edemi periferici (zona sacrale del pz a letto)  
ritto apicale ampio  
toni cardiaci parafonici  
frequenti soffi da insufficienza mitralica e tricuspidalica

- **DIAGNOSI:**

ECG:

- Scarsa progressione onda R nelle precordiali
- QS nelle precordiali
- Alterazione diffusa della ripolarizzazione
- BBS
- Tachiaritmia

ECOCARDIOGRAMMA: è l'esame più utile, consente di valutare

- Dimensioni cavità
- Frazione d'eiezione
- Insufficienza valvolare
- P ventricolari
- Funzione diastolica

ECOCARDIOGRAFIA:

- FRAZIONE di eiezione vs < 40%
- Dimensione vs > 2,7 cm/m<sup>2</sup>

RX TORACE

- Rapporto cardiotoracico > 0,55, più alto è più è negativa la prognosi

STUDIO EMODINAMICO: pz con sospetto di coronaropatia o ai candidati per trapianto di cuore

### VENTRICOLOGRAFIA

### SCINTIGRAFIA

### ENDOMIOCARDIOBIOPSIA

- **TERAPIA:**

in base ai vari stadi:

- I stadio . ACE INIBITORI+→FOSINOPRIL
- II stadio: DIURETICI + B BLOCCANTI + DIGOSSINA
- Iii,IV,V stadio si da anche lo spirinolattone

- **Fattori prognostici sfavorevoli :**

- classe NHYA IV
- BBs
- Durata prolungata sintomi
- Presenza terzo tono cardiaco
- Fibrillazione atriale
- Ectopia ventricolare
- Aum P ventricolare ,P atrio dx
- Aum resist periferica
- Rid consumo O2
- Insuff mitralica
- Anomalie cinetica

- Mortalità 64% a un anno dalla diagnosi

- **Aspetti genetici:** ora c'è un 50% di casi familiari

- Più di 10 i geni candidati
- Sono proteine del sarcomero,trans membrana,del citoscheletro,nucleari.
- Esiste una eterogeneità genetica

## **CARDIOMIOPATIE ARITMOGENE**

- ✓ ELEVATA FREQUENZA DI ARITMIE ventricolari che possono portare anche a morte improvvisa del pz.Di solito nn si associano ad alterazioni strutturali del miocardio
- ✓ La maggior parte di tali aritmie si manifestano in corso di patologia ischemia,ma possono essere anche ereditarie spt nei giovani
- ✓ Con l'aumentare dell'età il rischio di morte per patologie genetiche aumenta

### **ARRESTO CARDIACO**

Si verifica in soggetti che presentano una patologia cardiaca,si è cercato di troovare parametri invasivi e non elettrocardiografici ma si sono dimostrati inaccurati.

Due grossi studi di popolazione han dimostrato che :

- il rischio di MCI aumenta di 2,69 volte solo se c'è storia di familiarità



Si possono verificare in corso di :

- cardiomiopatia ipertrofica
- displasia aritmogena Vdx

### **SINDROME DI BRUGADA:**

- fibrillazione ventricolare idiopatica caratterizzata dalla presenza di blocco di branca sx ed elevazione del tratto St nelle precordiali di dx
- patologia ereditaria a trasmissione autosomica dominante
- assenza di cardiomiopatia strutturale → cuore sano
- rischio di Mi in giovani M tra 30-40 anni ,nel sonno o a riposo.
- Può nn essere evidente al tracciato per questo si fanno test di provocazione: con flecainide 2mg/pro kg ev ,dopo 10 min avremo segni tipici della sindrome sempre nelle precordiali dx
- Correlata a mutazione del SCN5A che codifica per il canale del Na
- Sono mutazioni missenso(per la mutazione di una singola base il codone di un aa viene convertito nel codone di un altro aa,possono essere causative → malattia o polimorfiche → non da malattia).A volte sono anche non senso

### **S.DI LEV-LENEGRE'**

- Malattia degenerativa del sistema di conduzione cardiaco associata ad alto rischio di MI
- Il difetto di conduzione per manifestarsi potrebbe richiedere la presenza di mutazioni del canale più alterazioni strutturali che si verificano nell'invecchiamento .questo spiega che:Le manifestazioni più gravi sono in età avanzata perché pare che ci debba essere anche una alterazione strutturale dovuta all'invecchiamento oltre alla mutazione del canale
- L'eterogeneità allelica può determinare un fenotipo diverso o sovrapposto(misto) SNC5A mutato può determinare sia la S.di Brugada che il difetto di conduzione

### **SINDROME DEL QT**, può essere:

1. LUNGO
2. CORTO

**QT LUNGO** : caratterizzata da alterazione elettrica che riguarda il processo di ripolarizzazione (più lungo della norma)

- Trasmessa con meccanismo autosomico dominante
- Mutazione di 5 diversi geni che codificano per proteine del trasporto degli ioni Na e K
- La forma con alterazione del trasporto del Na è la LQT3
- Più è lungo il QT più è precoce la morte del paziente
- Una caratteristica da considerare è la presenza di una gobbetta sulla branca ascendente dell'onda T(onda matched)

- Questi pazienti per la lunghezza del QT possono andare incontro a torsione di punta (inversione dei complessi) con possibile MI per innesco di tachicardia ventricolare, fino alla fibrillazione ventricolare e morte. E' molto pericoloso, tanto che si impiante il defibrillatore preventivo

## **Alterazione canale del K**

- S. DEL QT LUNGO (QT1-2-5-6-7) } da perdita di funzione
- S. DI LEU-LENEGRE } da perdita di funzione
- S. DEL QT CORTO da guadagno di funzione

## **S. DEL QT LUNGO (QT1-2-5-6-7)**

I Geni coinvolti sono presenti su crom differenti

KCNQ1 e KCNE1 sono 2 geni responsabili della sindrome di Jervelle-lange-Nielsen

(una variante di LQT)

## **S. DI ROMANO-WARD**

- Si trasmette con modalità A. Dominante
  - Ha penetranza incompleta (non tutti i soggetti che possiedono il gene mutato manifestano la malattia)
  - Sospetto diagnostico:
    - ✓ perdita di coscienza o arresto cardiaco
    - ✓ e/o familiarità di MI
  - ECG (gold standard)
    - ✓ Nel 60-70% QT allungato
    - ✓ 12% circa QT normale a riposo
    - ✓ Nel restante 20% QT normale o appena aumentato
  - Terapia:
    - ✓ B bloccanti
- Il gene coinvolto influenza la prognosi:
- ✓ LQT3 → farmaci Na bloccanti
  - ✓ LQT2 → dosi suppletive di K per attivare il canale
- Nei casi refrattari → impianto defibrillatore
- Farmaci sconsigliati:
- ✓ Antibiotici, antimicotici, antidepressivi, neurolettici, gastrocinetici, antiemetici
  - ✓ Anestetici, attenzione ai volatili
  - ✓ Evitare adrenalina in odontoiatria
- Non possono praticare sport agonisti come solo se seguiti attività fisica moderata e regime controllato

## **S. DI JERVELL-LANGE-NIELSEN**

Trasmessa autosomica recessiva da entrambi i genitori portatori

Sordità neurosensoriale associata

## **SINDROME DEL QT CORTO**

Associata a :

- fibrillazione atriale
- sincope
- MI
- Nel corso di stimolazione elettrica programmata i periodi refrattari atriale e ventricolare sono accorciati con il rischio di indurre una tachiaritmia ventricolare.
- La morte improvvisa (MI) può verificarsi in qualsiasi età anche neonatale (morte in culla)
- QT > 300-329 ms
- Onde T alte e appuntite
- Autosomica dominante

SQT S1:KCNH2 O HERG

SQT S2:KCNQ1

SQT S3KCNF

- Mutazioni che causano guadagno di funzione
- Accorciamento del periodo refrattario effettivo più aumento della dispersione della ripolarizzazione favoriscono il rientro dello stimolo e l'innescamento di tachiaritmie fatali
- **Terapia:**  
non ancora nota la migliore
- ✓ nei pz sintomatici → impianto defibrillatore
- ✓ nei bambini adolescenti in aggiunta → Quinidina è in grado di allungare il QT e quindi di normalizzare i periodi refrattari effettivi di atrio e ventricolo in pz con SQT1

## **Alterazione canale del Ca**

- S. DI TIMOTHY
- Predisposizione all'ipertermia maligna
- Mutazione gene calsequestrina cardiaca
- Tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (può sfociare in fibrillazione ventricolare)

## **S. DI TIMOTHY**

- Elevata mortalità

- Associata ad alterazione di altri organi e sistemi
- Anomalie fenotipiche
  - ✓ Aumento QT
  - ✓ Aritmie fatali
  - ✓ Sindattilia muco cutanea mani e piedi
  - ✓ Cardiopatia congenita
  - ✓ Autismo-ritardo linguaggio
  - ✓ Alterazione risp immunitaria
  - ✓ Alteraz metabolismo glucidico
  - ✓ Calvi e facies lunaris
  - ✓ Volto schiacciato in avanti
  - ✓ Onde T alternanti
  - ✓ Possibile tachicardia ventricolare polimorfa
- trasmissione autosomica dominante o recessiva
- i genitori possono essere portatori di mosaicismo(difetto genetico solo in alcune cellule senza manifestare malattia o con alcuni segni
- difetti sul gene CAV1-2 nel crom 12 che altera le correnti al Ca
- terapia:
- B bloccanti ,in studio farmaci che bloccano l'ingresso di Ca  
Di scelta: impianto di defibrillazione  
Import è la correzione di anomalie associate

## **CFVT**

- Alterazione della regolazione del flusso di Ca all'interno delle camere cardiache
- Aumenta la vulnerabilità del cuore alle aritmie,spt quando aumentano le catecolamine,in tal caso durante sforzo o stress si possono avere:
  - Aritmie
  - perdita di coscienza
  - MI
- Nota anche come "tachicardia ventricolare bidirezionale"
- 2 geni responsabili di tale aritmie
  - ✓ RYR2: sul cromosoma 1 codifica per la rianodina→predisposizione all'ipertermia maligna→autosomica dominante
  - ✓ CASQ2:sul cromosoma 2 codifica per la calsequestrina→autosomica recessiva
- Diagnosi:
- Test da sforzo ed Holter,nei pz che hanno presentato uno svenimento .spt in condizioni di stress fisico o emotivo o cn storia familiare di MI in età giovanile
- I pz presentano aritmie di vario grado,la sintomatologia è direttam proporzionale all'età
- Terapia:B bloccanti in tutti i pz con aritmie ventricolari o con familiarità con CPVT con eventi sincopali

- Non possono fare attività sportiva a livello agonistico, anche l'attività ludico ricreativa deve essere limitata

## **CARDIOMIOPATIE GENETICHE**

### **Displasia aritmogena del vdx**

- Causa: degenerazione miocardica vdx

Necrosi o apoptosi



Sostituzione con tessuto fibroso e adiposo con assottigliamento parete



Coinvolgimento di tutto il vdx aneurisma



Rottura cuore

- 6 geni sono responsabili, uno di questi è lo stesso della CPVT
- Diagnosi:
  - il primo segno può essere:  
astenia + battito irregolare
- maggiore causa di morte, in Italia maggiore incidenza al nord, in genere giovani <25 aa e atleti competitivi
- diagnosi: difficile, spesso tardiva
  - anamnesi
  - clinica
  - ECG (T invertita)
  - ECO (parete vdx sottile, aspetto aneurismatico)
  - RMN se eco non è dirimente

esiste una variante A. recessiva, dovuta al gene 17q21 che codifica per la PLACO, è denominata NAXOS (più frequente sull'isola greca). Si associa a capelli lanosi, cheratosi palmo mani e pianta piedi

### **RUOLO GENETICA:**

- IDENTIFICAZIONE DIFETTI GENETICI IN SOGGETTI CLINICAMENTE AFFETTI PER LA STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO E PER UNA TERAPIA GENE-SPECIFICA
- IDENTIFICAZIONE SOGGETTI PORTATORI SILENTI DI DIFETTI GENETICI POTENZIALMENTE A RISCHIO I SVILUPPARE ARITMIE
- DIAGNOSI PRENATALE

## **Distrofie muscolari**

Malattie geneticamente determinate ed a decorso cronico-progressivo, riconducibili dipendenti da un processo degenerativo primario che interessa il muscolo scheletrico.

Classificazione delle distrofie muscolari basata sulle modalità di trasmissione:

### ***A trasmissione X-linked***

- DM di Duchenne
- DM di Becker
- DM di Emery-Dreifuss

### ***A trasmissione autosomica dominante***

- DM dei cingoli autosomiche dominanti
- DM facio-scapolo-omerale
- DM scapolo-peroneale
- DM distale
- DM oculo-faringea

### ***A trasmissione autosomica recessiva***

- DM dei cingoli autosomiche recessive
- DM congenite

## **DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE**

### **Etio-patogenesi**

È dovuta all'assenza di **distrofina**, proteina codificata da un gene localizzato nel locus p21 del cromosoma X. Si trasmette come carattere recessivo legato all'X. Pertanto si manifesta solo nei maschi, mentre le femmine sono portatrici sane. I figli maschi di una portatrice hanno un rischio del 50% di nascere malati, mentre le figlie femmine hanno un rischio del 50% di essere portatrici. La donna portatrice può presentare segni laboratoristici o perfino clinici di malattia se la lyonizzazione (soppressione di uno dei 2 cromosomi X durante l'embriogenesi) avviene in modo sfavorevole, con prevalente soppressione del cromosoma x sano rispetto a quello malato.

Disrofina: proteina localizzata, nel muscolo normale, tangenzialmente alla superficie interna del sarcolemma. Il dominio N-terminale si lega all'actina mentre il dominio C-terminale, ricco in cisteine, si lega al beta-distroglicano, proteina transmembrana che, tramite l'alfa-distroglicano, interagisce con la laminina, componente della matrice extracellulare. Al complesso dei distroglicani (beta ed alfa) si associa il complesso dei sarcoglicani (4 glicoproteine transmembrana: alfa, beta, gamma e delta-sarcoglicano). Quindi, la funzione della distrofina, sarebbe quella di stabilire continuità tra citoscheletro e matrice extracellulare.

Tale complesso distrofina-glicoproteine conferisce supporto strutturale e resistenza al sarcolemma. La mutazione di ciascun membro di questo complesso può dar luogo ad una distrofia muscolare differente.

La distrofina manca perché il gene che la codifica è interessato da mutazioni (DELEZIONI nella maggior parte dei casi, ma anche mutazioni puntiformi -20 % dei casi- e duplicazioni -10 % dei casi) in virtù delle quali vengono introdotti codoni di stop responsabili dell'arresto dello schema di lettura.

Mancanza di distrofina → lesioni del sarcolemma (delta lesions) → ingresso di Ca<sup>2+</sup> → Attivazione di proteasi endogene → necrosi della fibra muscolare.

N.B. Per un certo tempo, coesistenza di processi degenerativi e rigenerativi. Poi, prevalenza di processi degenerativi con progressiva sostituzione del tessuto muscolare da parte di tessuto fibro-adiposo.

### Clinica

Segno suggestivo: inizio ritardato della deambulazione → 18 mesi (i bambini sani iniziano a deambulare verso i 12-13 mesi)

Esordio: 2-5 anni.

Manifestazioni:

- Andatura basculante (anserina), per interessamento dei muscoli glutei e retrazione del tendine di Achille che impone ai piedi una flessione plantare.
- Difficoltà nel salire le scale e, soprattutto, nel rialzarsi da terra che diventa possibile solo con una manovra di arrampicamento, manovra di Gowers per ipo/astenia dei muscoli assiali.
- Scoliosi ed iperlordosi lombare, per ipo/astenia dei muscoli assiali.
- Ipertrofia dei polpacci, per sostituzione del tessuto muscolare con tessuto fibro-adiposo.
- Ipostenia dei muscoli prossimali degli arti inferiori e successivamente di quelli degli arti superiori.

L'interessamento muscolare è progressivo con il pz. che perde la capacità di deambulare verso i 9-12 anni. Intorno ai 20 anni tutta la muscolatura scheletrica risulta coinvolta.

La velocità con cui la patologia evolve è condizionata dalla temperatura ambientale: più alta è la temperatura, più è rapida l'evoluzione della patologia.

Nella metà dei casi è presente una pseudo-insufficienza mentale.

A carico dell'apparato respiratorio si riscontra un precoce arresto dell'accrescimento fisiologico della capacità vitale, CV (quantità d'aria emessa con un'espiazione massimale dopo un'inspirazione forzata). Infatti, mentre nel soggetto sano, la CV aumenta progressivamente durante l'adolescenza raggiungendo un plateau in età adulta, nel pz con DM di Duchenne la CV cessa di crescere anticipatamente attestandosi su valori più bassi. Inoltre, una volta raggiunto il plateau, decresce di circa 200 ml/anno. Ciò è dovuto alla mancata deambulazione e alla compromissione della muscolatura respiratoria.

L'età in cui si arresta la crescita della CV costituisce un indice prognostico: più bassa e quest'età più sfavorevole sarà la prognosi. Infatti la principale causa di morte nel pz con DM di Duchenne è l'insufficienza respiratoria.

Il muscolo cardiaco viene compromesso nella maggior parte dei pz. affetti da DM di Duchenne.

L'interessamento miocardico consiste in una **cardiomiopatia distrofinopatica**.

Tale condizione, inizialmente asintomatica, viene diagnosticata solo mediante ECG ed ECOcardiogramma, intorno ai 6 anni di vita. Diventa conclamata generalmente all'età di 18 anni.

Nella **cardiomiopatia distrofinopatica**, i cardiomiociti conoscono apoptosi e sono progressivamente sostituiti da tessuto fibroso. L'apoptosi dei cardiomiociti può causare un dolore precordiale costrittivo simulante un IMA. La fibrosi miocardica produce all'ECG onde Q che differiscono da quelle di necrosi, perché seguite da onde R non alte, ma basse. Attraverso l'ECG è possibile calcolare anche l'indice cardiomiopatico.  $\frac{\sqrt{PQ} \cdot QT}{\sqrt{R-R} \cdot PQ}$  Il valore normale è compreso tra 2,6 e

4,2. Nei pazienti con cardiomiopatia distrofinopatica aumenta di molto.

In una fase intermedia, che compare tra 10 e 13 anni, la condizione morbosa può comportare un'ipertrofia miocardica localizzata, oppure aritmie (riconoscibili mediante ECG holter delle 24 ore).

La fibrosi miocardica, inizialmente parcellare, diventa diffusa, fino a coinvolgere tutto il miocardio, provocandone dilatazione (stadio finale). L'aspetto ECGgrafico della fibrosi diffusa consiste in onde Q, seguite da onde R basse in D1 e nelle precordiali di sinistra.

L'entità e l'evoluzione della fibrosi vengono evidenziate dall'ecocardiografia.

La **cardiomiopatia distrofinopatica**, quindi, in fase avanzata assume carattere dilatativo, determinando scompenso cardiaco congestivo, ben presto refrattario alla terapia. Sul piano clinico si riscontrano: pressione arteriosa, normale o aumentata; distensione delle vene giugulari; epatomegalia congestizia; edema polmonare; edemi degli arti inferiori.

All'ECO si osservano dilatazioni delle camere ventricolari, discinesie ed ipocinesie, FE < 45%.

#### Iter diagnostico

1. Quadro clinico ed anamnestico suggestivo.
2. Dosaggio all'età di 1 o 2 anni delle transaminasi → aumento di 6-7 volte (considerando che alcune isoforme sono presenti anche nel muscolo, e non solo nel fegato).
3. Dosaggio degli enzimi muscolari ed in particolare, della creatinichinasi (CK) → la CK raggiunge valori elevati, oltre 100 volte la norma, con predominanza della componente muscolare scheletrica MM. L'acme si raggiunge intorno ai 3 anni di vita, dopodiché si osserva un progressivo decremento per deplezione delle fibrocellule muscolari. Anche altri enzimi contenuti nei muscoli LDH, FA e PK risultano aumentati.
4. Elettromiografia → riduzione ampiezza e durata dei PDA.
5. Biopsia muscolare → fibre muscolari di calibro variabile; fibre in degenerazione; fenomeni di necrosi con invasione macrofagica; sostituzione progressiva del tessuto muscolare con tessuto fibro-adiposo.
  - Immunoistochimica/ immunoblot → completa assenza della distrofina

Utili sono, inoltre, spirometria, ECG ed ecocardiogramma, radiografia della colonna vertebrale.

La diagnosi prenatale può essere eseguita mediante amniocentesi o villocentesi, con analisi, secondo Southern Blot e/o PCR del DNA del feto maschio.

L'identificazione della donna portatrice sana nelle famiglie in cui vi sia un maschio affetto, si basa sulla determinazione della CK sierica.

#### Terapia

Steroidi a lungo termine.

Assistenza ventilatoria.

Fisioterapia.

Trattamento farmacologico della patologia cardiaca.

## **DISTROFIA MUSCOLARE DI BECKER**

È dovuta ad una mutazione (generalmente una delezione, meno spesso una mutazione puntiforme) del gene codificante per la distrofina e localizzato in Xp21. Tale mutazione, a differenza di quella responsabile della DM di Duchenne, comporta la sintesi di una distrofina anomala (ipofunzionante). La trasmissione è recessiva legata all'X.

#### Clinica

Il quadro clinico è sovrapponibile a quello della DM di Duchenne, ma:

- Esordio dopo i 5 anni;
- Lenta progressione, tanto che la capacità di deambulare autonomamente non sempre viene perduta e mai prima dell'età adulta;
- Compromissione cardiaca meno frequente (talora una cardiomiopatia dilatativa può costituire l'unico segno della malattia);
- Intelligenza non compromessa;
- Durata della vita solo di poco abbreviata.

### Diagnosi

La diagnosi differenziale, con la DM di Duchenne, è confermata dalla biopsia muscolare che, mediante immunoblotting, rivela una distrofina presente, ma qualitativamente anomala.

## **DISTROFIA MUSCOLARE DI EMERY-DREIFUSS**

È dovuta a mutazioni del gene localizzato in Xq28 codificante per l'emerina, proteina deputata a mantenere la forma e l'integrità del nucleo delle fibrocellule muscolari. Si tratta pertanto di un'"emerinopatia". Trasmissione recessiva legata all'X.

Età d'esordio: 5-10 anni.

L'interessamento muscolare, con ipotrofia ed ipostenia, è prevalente a livello omero-peroneale. Si osservano contratture muscolari con limitazione in flessione del gomito e del rachide cervicale (rigidità nucale). Assente l'ipertrofia dei polpacci.

Il coinvolgimento cardiaco è costante, manifestandosi con aritmie ed in particolare con disturbi della conduzione atrio-ventricolare.

Il livelli della CK sono lievemente aumentati.

La biopsia muscolare rivela un quadro distrofico con ploidimensionalità delle fibre.

Importanti sono ECG, ECG secondo Holter, ecocardiogramma.

La terapia prevede:

- Correzione delle contratture muscolari
- Impianto di pace-maker

## **DISTROFIA FACIO-SCAPOLO-OMERALE o MALATTIA di LANDOUZY- DÉJÉRINE**

È una delle forme più frequenti di distrofia muscolare.

Ha trasmissione autosomica dominante.

Si riconoscono due forme:

- **Forma classica**  
È causata nel 90% dei casi dalla delezione di un frammento di DNA nella regione subtelomerica del cromosoma 4, in sede q35.  
Esordisce tra i 7 e i 15 anni, con debolezza dei muscoli orbicolari dell'occhio e della bocca che rende impossibile chiudere gli occhi con forza, fischiare e gonfiare le gote.  
Successivamente, con una lenta progressione, vengono interessati i muscoli periscapolari ("scapola alata"), i pettorali, i bicipiti ed i tricipiti brachiali e peroneali; scarsamente coinvolti, invece, sono i muscoli deltoidi e quelli dell'avambraccio.  
Tale distribuzione dell'ipostenia tende a restare immodificata anche per molti anni e, solo nelle fasi più tardive, vi può essere compromissione dei muscoli prossimali degli arti inferiori e del cingolo pelvico.

- **Forma infantile**  
L'esordio è precoce, intorno ai 2 anni e la distribuzione dell'ipostenia ricalca quella dell'adulto, ma con un maggior grado di severità. Generalmente la compromissione dei muscoli facciali è tale da dar luogo a completa amimia. La perdita della deambulazione per interessamento dei muscoli degli arti si verifica intorno ai 10 anni. Caratteristica è la marcata lordosi lombo-sacrale di tipo compensativo (scompare, infatti, appena il bambino si siede).  
In alcuni casi possono associarsi ipoacusia neurosensoriale e teleangectasie retiniche configurando il quadro della sindrome di Coat

#### Iter diagnostico

- Anamnesi genetica → positiva
- Enzimi muscolari (sopr. CK) → lievemente elevati (presentano variazioni nel corso della malattia in relazione all'attività della stessa)
- EMG → riduzione dell'ampiezza e della durata dei PDA con incremento degli aspetti polibasi.
- Biopsia muscolare → polidimensionalità delle fibre muscolari, lieve fibrosi, infiltrati mononucleati.

## **DISTROFIE MUSCOLARI DEI CINGOLI (LGMD o LIMB-GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHIES)**

Si riconoscono forme autosomiche dominanti e forme autosomiche recessive.

### **Forme autosomiche dominanti**

Ne sono state descritte 7, di cui solo 3 sono state caratterizzate.

Sono le forme più benigne e più rare (meno del 10% di tutte le LGMD):

1. **LGMD 1A** (1= dominante; A=gene coinvolto)  
Dovuta a mutazione del gene codificante per la miotilina.
2. **LGMD 1B**  
Dovuta a mutazione del gene codificante per la lamina A/C (proteina deputata a mantenere la forma e l'integrità del nucleo delle fibrocellule muscolari); si tratta pertanto di una "laminopatia".  
Età d'esordio: 9-65 anni.  
La presentazione fenotipica è variabile, potendosi riscontrare:
  - Distrofia dei cingoli isolata
  - Cardiomiopatia isolata
  - Distrofia di cingoli + cardiomiopatia
  - IperCKemia asintomaticaL'interessamento muscolare, con ipotrofia ed ipostenia, è prevalente a livello omero-peroneale. Si osservano contratture muscolari con limitazione in flessione del gomito e del rachide cervicale (rigidità nucale) → impegno muscolare sovrapponibile a quello della DM di Emery-Dreifuss.  
Il coinvolgimento cardiaco può determinare cardiomiopatia dilatativa, frequenti aritmie per incoordinazione atrio-ventricolare, morte improvvisa in età giovanile (importante impianto precoce di pace-maker o defibrillatore).

3. LGMD 1C  
Dovuto a mutazione del gene codificante per la caveolina.
4. LGMD 1D
5. LGMD 1E
6. LGMD 1F
7. LGMD 1G

### **Forme autosomiche recessive**

1. **LGMD 2A (2=recessiva, A=gene coinvolto)**  
Dovuta a mutazioni (piccole delezioni e sostituzioni di singole basi) del gene codificante per la calpaina (enzima correlato al complesso delle proteine del sarcolemma); si tratta pertanto di una "calpainopatia".  
È la forma più frequente di LGMD. Si riscontra soprattutto nel sud Italia e nella Laguna veneta.  
Età d'esordio: 14-56 anni.  
Si riscontra progressiva compromissione dei 2 cingoli, con evidente scollamento delle scapole.  
L'evoluzione più grave è nei maschi.  
I valori della CK oscillano tra normali e molto alti, soprattutto nello stadio preclinico.  
Il coinvolgimento cardiaco è assente nel 67,5% dei casi.  
Il coinvolgimento respiratorio è graduale, con deterioramento della CV nel 30% dei casi.
2. **LGMD 2B**  
Dovuta a mutazioni (piccole delezioni o sostituzioni di singole basi) del gene della disferlina; si tratta pertanto di una "disferlinopatia".  
Età d'esordio: 18-48 anni.  
Insorge bruscamente nei pazienti che spesso hanno fatto intensi sport agonistici.  
Il coinvolgimento dei cingoli, con manifestazioni come lo scollamento delle scapole, risulta meno significativo. Più evidente è l'interessamento dei muscoli distali, con atrofia della loggia posteriore delle gambe.  
La CK presenta livelli molto elevati. L'evoluzione è identica in entrambi i sessi.  
Il coinvolgimento respiratorio è assente.  
Il coinvolgimento cardiaco, con aritmie, è presente nel 20% dei pazienti.
3. **LGMD 2C, 2D, 2E, 2F**  
Sono "sarcoglicanopatie" perché rispettivamente dovute a mutazioni dei sarcoglicani beta, alfa, gamma e delta.  
Le forme 2C e 2D si riscontrano nel nord-est, con la 2C rara e la 2D frequente. Nel sud Italia, invece, prevale la 2C, per la quale sono state osservate due mutazioni tipiche.  
Età d'esordio: 4-48 anni.  
Evoluzioni identiche in entrambi i sessi.  
I livelli di CK variano da elevati a molto elevati negli stadi iniziali.  
Per quanto riguarda il coinvolgimento cardiaco, nelle forme 2C e 2F è frequente l'evoluzione verso la cardiomiopatia dilatativa e lo scompenso cardiaco. Nella forma 2E si riscontra, invece una cardiomiopatia aritmogena.  
L'interessamento respiratorio è presente in tutte e 4 le forme con gravità variabile.
4. **LGMD 2G**  
È dovuta a mutazione del gene codificante per la telethonina.  
Si riscontrano interessamento muscolare prossimale e distale, cardiomiopatia.
5. **LGMD 2H**  
Dovuta a mutazioni del gene codificante per TRIM32.  
Età d'esordio: 15-73 anni.

I  $\frac{3}{4}$  delle persone colpite sono maschi. Scoperta presso comunità chiuse (anabattisti, mormoni) americane ma di origine europea, dedite a matrimoni tra consanguinei.

All'interessamento dei muscoli dei cingoli, si associano:

- Ipertrofia dei gastrocnemi nei bambini
- Atrofia dei muscoli del volto negli adulti.

I livelli di CK sono normali o poco aumentati.

Il coinvolgimento cardiaco comporta blocco di branca destra, più frequente nei pz. in età avanzata.

L'interessamento respiratorio consiste in un deficit respiratorio restrittivo.

**6. LGMD 2I**

Dovuto a mutazioni del gene codificante per la fukutin-related protein. Sono state identificate due mutazioni: R54W (evoluzione più rapida e più grave) e L276I.

Rapporto maschi:femmine= 11:4

I valori di CK variano da elevati a molto elevati.

Il coinvolgimento cardiaco è assente.

Il coinvolgimento respiratorio comporta un graduale deterioramento della CV nel 70% dei pazienti che spesso necessitano di ventilazione meccanica assistita. La morte sopraggiunge per insufficienza respiratorio.

**7. LGMD 2J**

Dovuta a mutazioni del gene codificante per la titina.

## **Atrofia muscolare spinale**

- **denominata anche malattia di Werdnig-Hoffmann, si intende un insieme di manifestazioni che riguardano una lenta e mortale degenerazione muscolare, rientra fra le distrofie muscolari**

### ***Tipologia***

A seconda dell'età di inizio dei primi sintomi nell'individuo si distinguono quattro forme:

- I, con esordio acuto-infantile
- II, con esordio intermedio-infantile
- III, con esordio giovanile
- IV, con esordio adulto

Fra tutte la più grave è la I.

### ***Sintomatologia***

Fra i sintomi e i segni clinici ritroviamo ipostenia, atrofia, debolezza muscolare<sup>[3]</sup> e paralisi.

### ***Prognosi***

*Fra le patologie autosomiche recessive è la seconda più mortale al mondo dopo la fibrosi cistica,*

## **Atrofia muscolare spinale e bulbare**

**chiamata anche malattia di Kennedy , si intende una malattia rara di carattere genetico.**

### **Epidemiologia**

Colpisce prevalentemente i maschi in età adulta, mentre nelle donne si mostra senza manifestazioni di rilievo,.

### ***Sintomatologia***

Fra i sintomi e i segni clinici si riscontrano ipostenia e atrofia (in particolare quella testicolare ), disturbi legati al desiderio sessuale.

## **Atrofia muscolare progressiva**

permette una sopravvivenza superiore ai dieci anni che invece viene considerato il limite della SLA.

### ***Differenze con la SLA***

In contrasto con la SLA, l'AMP si distingue per l'assenza di:

- Riflessi vivaci
- Spasticità
- Segno di Babinski
- Labilità emotiva

L'atrofia muscolare spinale viene suddivisa in diverse forme cliniche chiamate:

- Malattia di Werdnig-Hoffmann (SMA I)
- SMA Intermedia (SMA II)
- SMA lieve, o Malattia di Kugelberg-Welander (SMA III)
- SMA IV
- SMA adulta legata al cromosoma X, o Sindrome di Kennedy.

L'atrofia muscolare spinale è una malattia caratterizzata da degenerazione dei motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale cui consegue atrofia e debolezza dei muscoli del tronco e degli arti. E' possibile dividere la SMA in tre tipi clinici secondo l'età d'insorgenza, il grado di compromissione muscolare e l'età del decesso.

**La SMA I**, nota come Malattia di Werdnig-Hoffmann, si manifesta entro i primissimi mesi di vita o, in utero, con una riduzione dei movimenti fetali spontanei. Il neonato si presenta con ipotonia e paralisi dei muscoli prossimali e del tronco. L'aspetto clinico più caratteristico è la presenza di respiro addominale con immobilità della gabbia toracica per paralisi dei muscoli intercostali e innalzamento ed abbassamento dell'addome per l'attività del diaframma cui è completamente affidata l'attività del respiro. Una certa motilità distale agli arti è presente e i muscoli del viso sono risparmiati: l'espressione è vivace e attenta. La malattia può essere manifesta già alla nascita o rendersi evidente, talora in modo acuto, dopo i primi mesi di vita durante i quali né i genitori né il pediatra avevano notato alcunché di anormale. La malattia ha un decorso rapido a causa della paralisi dei muscoli respiratori per cui la minima infezione bronco-polmonare può risultare fatale. La morte interviene di solito nei primi 6-8 mesi, raramente i bimbi superano l'anno di vita. Come abbiamo detto la gravità sfuma da un tipo all'altro e eccezionalmente qualche bambino con esordio nei primi 6 mesi e incapacità a stare seduto da solo e quindi con la forma grave della malattia può sopravvivere più a lungo.

**La SMA II**, o forma intermedia della SMA, esordisce dopo i primi sei mesi di vita durante i quali il bimbo si era mosso apparentemente in modo normale. Anche in questo caso l'esordio può apparire acuto. Il bambino non si regge sui piedi ma può stare seduto con equilibrio una volta messo in quella posizione. L'atrofia e la paralisi muscolare sono particolarmente importanti nei muscoli del bacino e degli arti inferiori motivo per cui il bambino non riesce a reggersi in piedi e neppure a camminare. I muscoli del tronco e quelli respiratori sono relativamente risparmiati per cui il bambino può stare seduto e respirare bene. Questi bambini sono intelligenti e spesso precoci nel parlare. Il decorso della malattia è di solito cronico con una aspettativa di vita fino ed oltre l'età adulta in molti casi. A causa della debolezza dei muscoli del tronco la colonna vertebrale tende ad incurvarsi prima in cifosi e poi in cifo-scoliosi. La scoliosi nella SMA intermedia ha un esordio spesso precoce (primi anni di vita), si aggrava con l'accrescimento puberale e anche successivamente. Nella seconda infanzia o nell'età adulta può manifestarsi in alcuni una insufficienza respiratoria tale da richiedere il trattamento con ventilazione meccanica.

**La SMA III**, o malattia di Kugelberg-Welander, si manifesta in una età molto variabile. Spesso la malattia si rende evidente nei primissimi anni quando già il bambino è in grado di camminare ed

allora si nota difficoltà nella corsa, nel salire le scale e nel rialzarsi da terra. Non raramente le stesse difficoltà possono apparire solo molto più tardi nell'età puberale o nel giovane adulto. Nei bambini in cui l'esordio è nei primi tre anni di vita la capacità di camminare può perdersi nella seconda decade di vita mentre in quelli in cui l'esordio è più tardivo il cammino può essere conservato nell'età adulta e oltre. Nella forma lieve i muscoli del tronco e quelli respiratori sono più validi per cui scoliosi e difficoltà respiratoria non sono di solito presenti.

**La SMA IV**, Normalmente nella forma che colpisce gli adulti i sintomi iniziano a manifestarsi dopo i trentacinque anni. Molto raramente l'atrofia muscolare spinale si manifesta fra i diciotto e i trent'anni. La SMA adulta si caratterizza per un inizio insidioso e una lenta progressione. I muscoli bulbari, che si utilizzano per la deglutizione e per la funzione respiratoria, raramente vengono colpiti nel tipo IV.

**La SMA Adulta legata al cromosoma X**, nota anche come Sindrome di Kennedy o atrofia muscolare bulbo-spinale, si manifesta solo nei maschi anche se la metà dei figli di sesso femminile risultano portatrici sane. Questa forma di SMA è associata ad una mutazione nel gene che codifica una parte del recettore androgeno; dunque questi pazienti maschi spesso sono soggetti ad un ingrossamento delle mammelle, detto ginecomastia. Anche i muscoli facciali e la lingua sono colpiti in maniera evidente. Come tutte le forme di SMA il decorso della malattia è variabile; in generale, comunque, essa tende a non progredire o a farlo lentamente.

**Eredità.** La malattia è trasmessa come carattere recessivo (a parte la Sindrome di Kennedy che è una forma legata al cromosoma X). Il soggetto malato ha entrambi i geni alterati (mutati) mentre i portatori sani hanno un gene mutato ed uno normale (selvatico).

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una malattia ereditaria dei motoneuroni dovuta a delezioni/mutazioni nel gene di sopravvivenza del motoneurone 1 (SMN1). Il gene SMN1 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5, nella regione 5q13. In questa regione ci sono 2 copie quasi identiche del gene, SMN1 e SMN2, che differiscono tra loro solo per 5 paia di basi nucleotidiche. Solo la contemporanea presenza sui due cromosomi di delezioni/mutazioni di SMN1, ma non di SMN2, è causa di SMA.

**Il gene SMN1.** Il gene responsabile della SMA è stato chiamato SMN1 che significa gene di sopravvivenza del motoneurone. Tale gene è localizzato sul cromosoma 5 nella regione 5q13 dove esiste inoltre un gene quasi identico a SMN1 che è denominato SMN2. La SMA è causata da assenza o alterazione del gene SMN1 a causa di delezione (mancanza), conversione di SMN1 in SMN2, o in rari casi (meno del 4%), piccole mutazioni. La delezione del solo gene SMN2 non dà invece luogo a malattia. Il gene SMN2 si differenzia nella regione codificante dal SMN1 solo per 2 nucleotidi, uno nell'esone 7 e uno nell'esone 8.

**La proteina SMN.** Il gene SMN1 codifica per la proteina SMN. Anche il gene SMN2 produce proteina SMN. Per questo motivo i pazienti SMA sono in grado di produrre una certa quantità di proteina SMN che però risulta insufficiente perché la maggior parte non è funzionale, in quanto manca del dominio codificato dall'esone 7. Quindi la malattia è causata da una insufficiente disponibilità di proteina SMN normale.

**La diagnosi di SMA.** La diagnosi è soprattutto clinica e deve essere confermata dall'indagine genetica

**Analisi dei portatori.** I genitori di pazienti SMA sono quasi sempre portatori sani, ed in quanto tali, il loro rischio di avere altri figli affetti è del 25% ad ogni nuova gravidanza. Le "nuove" mutazioni del gene SMN1 sono rare (meno del 2%); è per questo motivo che i genitori degli affetti sono quasi sempre entrambi portatori del gene alterato. Invece, i fratelli di pazienti SMA hanno la probabilità del 50% di essere portatori sani. **E' divenuto recentemente possibile l'analisi dei portatori della SMA. Il test è quantitativo e mette in evidenza il numero di geni SMN1.** Tale test non evidenzia anomalie nei portatori con più di un gene SMN1 su uno stesso cromosoma e mancanza del gene SMN1 sull'altro. Pertanto l'affidabilità del test non è assoluta ma pari al 95% circa.

**La diagnosi prenatale.** Nei casi in cui l'analisi genetica ha confermato la diagnosi clinica di SMA, è possibile il monitoraggio delle successive gravidanze della coppia, mediante analisi dei villi coriali.

I

## EMOGLOBINOPATIE

Le emoglobinopatie sono situazioni di emoglobine difettose dovute alla scarsa produzione di proteine da parte dei geni o alla totale inoperosità di questi ultimi. Esistono diversi tipi di emoglobine, che andremo ora a conoscere:

- Emoglobina A - E' il nome della normale emoglobina in persone sane
- Emoglobina S - Prodotta da geni che sono stati colpiti da una mutazione definiti "falciformi", è di fatto una mutazione della precedente emoglobina
- Emoglobina C - Altra forma di anomalia dell'emoglobina A, è piuttosto diffusa nelle popolazioni di discendenza Africana
- Emoglobina E - Questa varietà di emoglobina comune in popolazioni di discendenza Asiatica crea rari e leggeri problemi. Un'eccezione importante è il caso in cui si sia ereditato l'emoglobina in questione e la talassemia BETA
- Emoglobina F - Questa è l'emoglobina prodotta dal feto prima della nascita e proviene da un gene completamente diverso da quelli che la producono dopo la nascita. I geni dell'emoglobina F sono comunque in stretta relazione con quelli dell'emoglobina A poiché dopo la nascita i geni F spariscono completamente, anche se può succedere che alcune persone continuino a produrre piccole quantità di emoglobina F per il loro fabbisogno organico.

Esistono 2 tipi di emoglobinopatie:

1. variazioni della sequenza amminoacidica della globina → ANEMIA FALCIFORME
2. squilibrio nella produzione delle globine → TALASSEMIE

## ANEMIA FALCIFORME

EREDITATA COME CARATTERE AUTOSOMICO RECESSIVO, con sostituzione di un singolo amminoacido nella catena polipeptidica della globina B.

Dopo aver rilasciato l'O<sub>2</sub> nei vari tessuti, l'Hb con le sub unità B mutate diventa insolubile, pertanto le molecole formano strutture tubulari all'interno della cellula, queste strutture finiscono con lisare la membrana dei grossi che vengono rimossi dal circolo. Le cellule a falce inoltre occludono i vasi **causando dolore e danno tissutale**

### **SINTOMATOLOGIA:**

debolezza, dolori addominale, IRN e cardiaca, polmonite, paralisi, fibrosi milza, deficit mentali

La forma più comune è lo stato omozigote per l'emoglobina S (originata dalla sostituzione dell'acido glutammico in valina nella posizione 6 della molecola emoglobinica). Più raramente l'anemia falciforme è dovuta a una doppia eterozigosi per l'emoglobina S e per la beta talassemia o per l'emoglobina C. La formazione di fibre intracellulari, originate dalla polimerizzazione dell'emoglobina S, provoca la deformazione a falce tipica del globulo rosso.

## **TALASSEMIE**

Il fenotipo deriva da un'alterazione del rapporto reciproco tra globine alfa e beta. In genere Hb contiene 2 molecole di ogni tipo di globina. Le molecole che ne risultano alterate non legano l'ossigeno determinando danni gravi.

Ci sono 2 tipi di talassemia:

**Talassemia alfa**, in cui la sintesi della globina alfa è ridotta o assente

1. **Talassemia beta**: che riguarda la sintesi della catena beta

Entrambe ereditate con carattere autosomico recessivo, ma danno effetti fenotipici in eterozigosi

**Talassemia alfa**: sono possibili 6 diversi genotipi, 5 dei quali hanno una sintomatologia che può essere anche letale

Le alfa talassemie sono un gruppo di disturbi ereditari della sintesi dell'emoglobina dovuti alla produzione difettosa ( $\alpha^+$ ) o assente ( $\alpha^0$ ) delle catene alfa della molecola dell'emoglobina. Ne consegue un eccesso di catene beta nell'adulto e di catene gamma nel neonato, che portano alla formazione di emoglobine patologiche:

- emoglobina H (beta 4)
- ed emoglobina di Bart (gamma 4),

Entrambe inefficienti nel trasporto dell'ossigeno. I tetrameri beta 4, precipitando, formano caratteristici corpi inclusi, visibili all'esame dello striscio periferico, importanti per la diagnosi. Queste alterazioni determinano un'eritropoiesi inefficace, ma soprattutto una riduzione dell'emivita del globulo rosso accompagnata da una marcata emolisi splenica.

**Talassemia beta**: ci sono diverse forme che raramente includono la delezione del gene, in alcuni casi la mutazione abbassa l'efficienza di processamento del pre-mRNA della beta globina in messaggero maturo. Nel caso della talassemia  $\beta^0$  una mutazione alla giunzione tra introne ed esone interferisce con il normale processo di splicing del messaggero, determinando la formazione di poche molecole di mRNA funzionali e quindi di poca globina beta. Ciò fa sì che le molecole di H abbiano 3 o 4 globine alfa.

Si distinguono forme  $\beta^0$ , dove la sintesi è del tutto assente, e forme  $\beta^+$ , in cui la sintesi è ridotta. Per la mancanza delle catene beta, le catene alfa non combinate precipitano e danneggiano la membrana del globulo rosso. Ne deriva la distruzione precoce dei precursori eritroidi nel midollo (eritropoiesi inefficace) e, in misura minore, nella milza (emolisi).

**Terapia:**

- agire sull'espressione genica con farmaci come:

- **l'idrossiurea** che determina l'espressione di emoglobina fetale che riduce la quantità di emoglobina mutata nell'anemia falciforme
- allo stesso modo anche il **sodio butirrato** che è meno tossico dell'idrossiurea utilizzato come antitumorale ancora in sperimentazione

## **Emofilia**

- malattia ereditaria recessiva umana comportante una grave insufficienza nella coagulazione del sangue dovuta alla mancanza, totale o parziale, del "fattore VIII" (emofilia A), o del "fattore IX" (emofilia B o malattia di Christmas), proteine presenti nel plasma. Più rara è l'emofilia C, data dalla mancanza totale o parziale del "fattore XI".

## **Epidemiologia**

L'emofilia colpisce quasi esclusivamente i maschi. Le poche donne affette sono frutto di un padre emofilico e una madre portatrice, oppure di mutazioni geniche.

## **Trasmissione**

La trasmissione dell'emofilia è spiegabile ammettendo che il gene per il fattore VIII, IX ed XI si trovi sul cromosoma X. In questo caso, infatti, per i maschi non esistono alleli dominanti o recessivi, essendo essi emizigoti, ossia possedendo un solo gene per quei caratteri. Inoltre l'unico X dei maschi è di origine materna. Una donna portatrice sana (eterozigote) dell'emofilia, quindi, avrà una probabilità 1/2 di generare un maschio ammalato mentre, se il marito è sano, le figlie femmine saranno al massimo portatrici come la madre.

Nel trenta per cento dei casi circa, i cosiddetti "casi sporadici", si tratta invece di una mutazione genica cosiddetta "de novo", in quanto è una mutazione di nuova formazione che si è verificata in un gamete, in questo caso quello materno.

## **Manifestazioni**

Le manifestazioni classificano l'emofilia A B e C in tre tipi, a seconda della mancanza più o meno marcata del fattore in esame:

- Moderata: sanguinamento articolare (emartro) o sanguinamento muscolare precoce, epistassi severa, gengivorragia persistente, ematuria persistente;
- Maggiore: sanguinamento articolare o muscolare avanzato, ematoma collo, lingua, faringe, trauma cranico senza deficit neurologici, trauma senza emorragie evidenti, dolore addominale severo, emorragia gastrointestinale;
- Gravissima: emorragia intracranica, trauma maggiore con emorragia, interventi chirurgici con emorragia, emorragia

## **L'emocromatosi genetica**

- L'emocromatosi genetica è una malattia ereditaria caratterizzata da un eccessivo accumulo di ferro nell'organismo. Quest'ultimo si sviluppa nel corso degli anni e in genere si manifesta clinicamente nella quarta-quinta decade di età.

- Normalmente il ferro viene assunto con l'alimentazione, e l'organismo di un soggetto non emocromatosico ne regola l'assorbimento dalla dieta a seconda delle necessità. Quando sono presenti i geni dell'emocromatosi, il meccanismo "intelligente" che regola l'assorbimento del minerale viene meno e la quantità assorbita è sempre e comunque superiore al fabbisogno. Occorrono parecchi anni prima che i danni agli organi dove si deposita il ferro in eccesso si rendano visibili, anche perché nell'età adulta il fabbisogno di questa sostanza si riduce.
- Quando si deve sospettare l'emocromatosi genetica? In assenza di cause note di sovraccarico di ferro o assunzione protratta di ferro a scopo terapeutico - basta riscontrare un aumento della ferritina plasmatica e della percentuale di saturazione della transferrina, per sospettare la malattia. Ovviamente i test andranno ripetuti e, se confermati, il paziente andrà sottoposto ad indagini più approfondite.
- I **danni** più evidenti sono a livello **del fegato**, ove il ferro si deposita dando luogo prima ad un ingrossamento dell'organo e poi a danni irreversibili come la cirrosi epatica. Altri organi danneggiati sono il **cuore**, il **pancreas** (da cui la possibilità di sviluppare il diabete), gli organi **endocrini** (tra questi particolarmente interessati l'ipofisi e i testicoli), ed infine le articolazioni.
- La terapia è estremamente semplice e consiste in salassi settimanali, equivalenti ad una donazione di sangue (circa 400 ml alla settimana), che permettono di rimuovere il ferro in eccesso depositato nell'organismo. I salassi infatti stimolano l'eritropoiesi, cioè la produzione di nuovi globuli rossi per sostituire quelli eliminati, e poiché il ferro è uno dei costituenti indispensabili per la formazione dei suddetti globuli, in questo processo si mobiliterà il minerale depositato nei tessuti.

Per quanto riguarda l'**ereditarietà**, l'emocromatosi si trasmette con modalità **autosomica recessiva**: Il gene responsabile della malattia, **detto HFE**, è sito sul braccio corto del cromosoma 6, in prossimità del locus del gene

L'**emosiderosi** o **emocromatosi secondaria** è una malattia dovuta a sovraccarico di ferro esogeno.

- "*Emosiderosi*" significa letteralmente "patologia dell'emosiderina". L'emosiderina è una forma di deposito stabile parenchimale del ferro. Nelle siderosi secondarie vi è infatti un interessamento non tanto dei parenchimi quanto del sistema reticolo-endoteliale, provocando un minor danno tissutale rispetto all'accumulo di ferro parenchimale.

## **Rene policistico**

**Il rene policistico**, è una condizione ereditaria caratterizzata dal progressivo sviluppo, all'interno del rene, di numerose cisti che, sostituendosi al tessuto funzionante, determinano nel giro di alcuni anni, una insufficienza renale<sup>1</sup>

Le **cisti renali semplici**, che possono essere uniche o multiple, sono relativamente comuni e non hanno carattere evolutivo, pertanto vanno distinte dalla malattia policistica che ha invece un decorso inevitabilmente progressivo.

### ***Ereditarietà***

La malattia policistica del rene si trasmette ereditariamente come carattere autosomico dominante con una penetranza del 100%.

- La localizzazione del gene responsabile è il piu' delle volte sul cromosoma 16 (gene PKD1), tuttavia e' provato che la stessa malattia puo' essere legata ad alterazioni del cromosoma 4 (gene PKD2) e, ancor piu' raramente, ad altre alterazioni cromosomiche.
- La diagnosi prenatale attraverso i marker del DNA è pertanto possibile è tuttavia necessario sapere su quale cromosoma è necessario cercare analizzando preventivamente almeno 4 familiari affetti.

Nel 30% dei pazienti, alle cisti renali si associano anche cisti epatiche e/o alla milza e/o al pancreas. Le cisti epatiche possono esser sede di infezione e comprimere (nei casi gravi) i dotti biliari ostacolando il deflusso della bile.

### ***Aspetti clinici***

In un un certo numero di casi il rene policistico è asintomatico.

- Nei rimanenti casi l'aumento progressivo delle dimensioni delle cisti porta a un'alterazione della funzionalità renale, che lentamente evolve verso gradi crescenti di insufficienza renale. Questa è piu' precoce nei casi di PKD1 rispetto ai casi di PKD2 conducendo all' insufficienza renale terminale , in media a 54 anni nel primo e 74 anni nel secondo caso <sup>[3]</sup>. Spesso è presente ematuria (presenza microscopica o macroscopica di sangue nelle urine), dovuta a emorragia all'interno delle cisti, o dolore dovuto allo sviluppo di calcoli o infezioni renali. Un evento drammatico, ma molto raro, e' la rottura di una cisti. Se questa avviene nelle vie urinarie si ha evidente ematuria, se invece la rottura avviene nel recesso retroperitoneale si ha dolore e febbre e spesso sintomi di peritonite. A volte reni policistici con grandi cisti possono dare sensazione di ingombro. Può comparire anche ipertensione, parallelamente all'aumento di dimensioni del rene.

### ***Diagnosi***

- Ecografia
- Tac ( nei casi dubbi)

## **Terapia**

- Prevenzione delle infezioni e della formazione di calcoli (può in qualche modo ritardare l'evoluzione della malattia)
- Dialisi o Trapianto renale.
- Controllo dell'ipertensione arteriosa e della dislipemia oltre che degli altri sintomi di insufficienza renale

## Rene policistico giovanile

È una variante molto più rara e si trasmette come carattere autosomico recessivo.

## **Sindrome di Alport**

La **sindrome di Alport** è una condizione genetica caratterizzata dalla progressiva perdita di funzione renale e uditiva. La sindrome di Alport può inoltre interessare gli occhi. La presenza di sangue nelle urine (ematuria) è quasi sempre riscontrabile nella patologia.

## **Eziologia**

La sindrome di Alport è causata da mutazioni dei geni *COL4A3*, *COL4A4* e *COL4A5*, codificanti catene di collagene. Mutazioni in tali geni impediscono la corretta produzione o l'assemblaggio della rete di collagene di tipo IV, che costituisce un importante componente strutturale delle membrane basali di rene, orecchio interno e occhio. Le membrane basali appaiono assottigliate, a morfologia di foglietto che separa e sostiene le cellule di molti tessuti.

Le membrane basali del rene non sono in grado di filtrare i prodotti di scarto presenti nel sangue affinché l'urina sia prodotta normalmente, bensì è permesso il passaggio di sangue e proteine nelle urine.

L'alterazione del collagene di tipo IV nelle membrane basali glomerulari (del rene) provocano una graduale cicatrizzazione del tessuto renale, e portano infine il paziente ad insufficienza renale nella maggior parte dei casi.

## **Ereditarietà**

- Nella maggior parte (80-85%) dei pazienti affetti da Sindrome di Alport, la patologia è trasmessa con un'ereditabilità legata all'X, dovuta a mutazioni nel gene *COL4A5*. Una condizione si considera legata all'X se il gene coinvolto nella malattia è localizzato sul cromosoma X.
  - **Nei soggetti di sesso maschile**, che possiedono un solo cromosoma X, una copia alterata del gene *COL4A5* è sufficiente per causare la Sindrome di Alport in forma severa, fino ad arrivare all'insufficienza renale.
  - **Nelle femmine**, che possiedono due cromosomi X, la mutazione di una copia di *COL4A5* solitamente provoca ematuria, ma nella maggior parte dei casi non arrivano mai all'insufficienza renale.

- La Sindrome di Alport può essere ereditata con configurazione autosomica recessiva se entrambe le copie dei geni *COL4A3* o *COL4A4*, collocati sul cromosoma 2 sono mutate.

### **Diagnosi clinica**

Esistono 10 criteri per la diagnosi della Sindrome di Alport, almeno quattro dei quali devono essere riscontrati:

- Storia familiare di nefrite con inspiegata ematuria
- Ematuria persistente senza diagnosi di alcuna altra nefropatia ereditaria
- Sordità neurosensoriale bilaterale La perdita di udito si sviluppa gradualmente, non è presente nella prima infanzia, ma spesso appare prima dei 30 anni.
- Una mutazione nel gene *COL4*
- Evidenza immunoistochimica di completa o parziale carenza dell'epitopo di Alport nelle membrane basali glomerulare e della pelle.
- Estese anomalie dell'ultrastruttura della membrana basale glomerulare, in particolare ispessimento, assottigliamento e slaminamento.
- Lesioni oculari, come lenticone anteriore, cataratta subcapsulare posteriore, distrofia polimorfa posteriore e chiazze retiniche.
- Progressione graduale all'insufficienza renale terminale nel caso indice di almeno due membri della famiglia.
- Macrotrombocitopenia o inclusioni granulocitiche.
- Diffusa leiomiomatosi dell'esofago o dei genitali femminili, o entrambi.

### **Sindrome nefrosica**

La **sindrome nefrosica** è un insieme di sintomi e segni clinici causati da una alterazione dei glomeruli renali che comporta una perdita di proteine con le urine di oltre i 3,5 grammi al giorno. La sindrome è caratterizzata dalla triade:

1. perdita di proteine
2. , edemi
3. ipercolesterolemia.

### **Sintomatologia**

- proteinuria
- ipoalbuminemia
- edema,
- iperlipidemia.
- anoressia, debolezza, lipiduria (perdita di lipidi con le urine),
- ipercoagulabilità
- anemia ipocromica microcitica.
- Si riscontra un'aumentata suscettibilità alle infezioni per deplezione IgG dovuta alle perdite urinarie di immunoglobuline e ipocalcemia (conseguente all'ipoalbuminemia) a cui può conseguire iperparatiroidismo e/o alterato metabolismo della vitamina D.

### **Eziologia e patogenesi**

La sindrome nefrosica può essere

1. **Primitiva**, cioè conseguente ad un danno primitivamente renale: glomerulopatia a lesioni minime, la glomerulosclerosi segmentaria e focale, la glomerulonefrite membranosa e la glomerulonefrite membranosa proliferativa.
2. **Secondaria**, cioè conseguente ad una malattia che non colpisce esclusivamente i reni. compare come complicanza di diverse malattie come la nefropatia diabetica, segue il lupus eritematoso sistemico ed il mieloma multiplo con le altre cause di amiloidosi.

### **Terapie**

- diuretici dell'ansa (come la furosemide)
- , eparina o Aspirina (per proteggere dalla ipercoagulabilità del sangue)
- antagonisti della sintesi del colesterolo (per ridurre l'ipercolesterolemia).
- gli ACE inibitori e i bloccanti del recettore dell'angiotensina) possono significativamente ridurre la proteinuria sia nella sindrome nefrosica primitiva che secondaria<sup>1</sup>
- La terapia causale varia in relazione alla causa della sindrome nefrosica. Nella maggior parte delle sindromi nefrosiche primitive si usa una combinazione di steroidi e immunosoppressori,
- . Nei casi in cui la sindrome nefrosica sia secondaria ad altre malattie la terapia coincide spesso con quella della malattia che l'ha causata. Prognosi [modifica]

**La prognosi** varia a seconda della causa della sindrome, solitamente è molto buona nei bambini (quando si tratta di glomerulopatia a lesioni minime). Nei casi di altre sindromi nefrosiche primitive si può assistere, in una percentuale variabile, alla remissione spontanea o con terapia, ma spesso la proteinuria permane ed essa alla lunga può determinare un danno renale (insufficienza renale) progressivo. Nei casi di sindrome nefrosica secondaria la prognosi è spesso connessa alla gravità della malattia che l'ha determinata,

### **Sindrome nefrosica congenita**

#### **1) Sindrome nefrosica congenita tipo finnico**

#### **2) Sclerosi mesangiale diffusa**

- Idiopatica
- Associata a pseudoermafroditismo (sindrome di Dash)
- Associata a microcefalia (sindrome di Galloway-Mowat)

#### **Sindrome nefrosica congenita tipo finnico**

Nefropatia ereditaria autosomica recessiva dovuta ad alterazioni genetiche al cromosoma 19 (gene della nefrina), proteina espressa dalle cellule epiteliali viscerali.

Presente alla nascita o subito dopo; nascita prematura con placenta ingrandita.

Pochi sopravvivono oltre il primo anno di vita.

Diagnosi prenatale: elevati livelli di a-feto-proteina nel liquido amniotico (espressione di proteinuria)

### **Morfologia**

Ipertrofia cellule epiteliali, aumento cellularità mesangiale, ispessimento irregolare pareti capillari.

Cisti corticali dei tubuli convoluti prossimali. Riportata recidiva della sindrome nefrosica dopo trapianto renale

### **Sclerosi mesangiale diffusa**

Proteinuria e sindrome nefrosica entro il primo annodi vita.

Iperensione arteriosa e progressione rapida verso la insufficienza renale entro i quattro anni di vita.

### **Morfologia**

Aumento della matrice mesangiale non associato ad aumento della cellularità, con sclerosi glomerulare progressiva

## **Tumore di Wilms**

Il **tumore di Wilms**, conosciuto principalmente con il nome di **nefroblastoma**, è un tumore maligno che deriva dal primitivo abbozzo renale.

Di solito si associa ad altre malformazioni o difetti congeniti del sistema uro-genitale o di altri sistemi.

Per lungo tempo decorre asintomatico, spesso la diagnosi è casuale.

### **Eziologia**

Può conseguire ad una sindrome ereditaria con mutazione del gene WT-1 (gene oncosoppressore). In questo caso il tumore insorge secondo la teoria del "doppio colpo": un oncosoppressore deve subire infatti mutazioni inattivanti su entrambi gli alleli per essere completamente non funzionale. In questo caso la prima mutazione risulta ereditaria e la seconda somatica.

La terapia, molto variabile, può essere chirurgica, radiante o chemioterapica.

## **Sindrome dell'X fragile**

- La **sindrome dell'X fragile** (o **sindrome di Martin Bell**) è una malattia genetica umana causata dalla mutazione del gene FMR1 sul cromosoma X. Si contende con la sindrome di Down il primato come causa genetica più comune di ritardo mentale.

Normalmente il gene FMR1 contiene tra 6 e 53 ripetizioni del codone CGG (ripetizioni di trinucleotidi). Negli individui affetti dalla sindrome dell'X fragile, l'allele FMR1 ha più di 230 ripetizioni di questo codone.

- Questo grado di espansione provoca la metilazione delle citosine nel promotore del gene FMR1, con conseguente silenziamento dell'espressione della gene FMR1
- I maschi portatori di un gene FMR1 con una significativa espansione del tripletto CGG presentano i sintomi della malattia, visto che normalmente possiedono una sola copia del cromosoma X. Le femmine, invece, possiedono due copie del cromosoma X e pertanto hanno una probabilità doppia di possedere almeno un allele funzionante.

A parte il **ritardo mentale di grado variabile** da severo a moderato,

- volto allungato
- grandi orecchie,
- grossi testicoli (macrorchidismo),
- basso tono muscolare.
- movimenti stereotipati (ad esempio, battere le mani)
- sviluppo sociale atipico.

### **TERAPIA**

- terapia del comportamento,
- un'educazione speciale,
- quando necessario, con un trattamento delle anomalie fisiche

## **Distrofia miotonica**

Per **distrofia miotonica** in campo medico, si intende una malattia genetica a carattere autosomico dominante, una delle distrofie muscolari più diffuse.

- Colpisce prevalentemente i giovani adulti di età compresa fra i 20 e i 25 anni,
- Esistono varie forme di distrofia miotonica, le più studiate sono:
  - **Distrofia miotonica di tipo 1**, detta anche la malattia di Steinert, individuata nel 1909,<sup>[1]</sup> di forma congenita.
  - **Distrofia miotonica di tipo 2**

**Sintomatologia** miopatia, disartria, atrofia, ipotiroidismo, ritardo mentale, molto risentito è il cuore, il suo apparato e i suoi tessuti,<sup>[2]</sup> portando a forme di cardiomiopatie che risultano diffuse.<sup>[3]</sup> Vi sono altri sintomi a seconda della forma, ad esempio nella seconda si osservano frequentemente anomalie del nistagmo

disfagia e dolore addominale<sup>1</sup> mentre nella prima forma si osservano disturbi dello spettro dell'autismo fra cui la sindrome di Tourette.

### **Diagnosi**

Per una corretta diagnosi si utilizzano, oltre alla normale anamnesi, alcuni esami particolari come l'elettromiografia.

### **Terapia**

Non esistono trattamenti efficaci contro tale forma di distrofia muscolare, per combattere in parte la miotonia si somministra la mexiletina (dosi 75 mg - 150 mg)

### **Prognosi**

La prognosi è infausta, la morte avviene entro i 50 anni, pochi sono i casi che testimoniano un'età più avanzata di tali soggetti, in particolare la tipologia 1 è più soggetta ad aritmie fatali che causano morte improvvisa.

## **Morbo di Huntington**

Il **morbo di Huntington** è una malattia degenerativa del sistema extrapiramidale che rientra nel capitolo delle sindromi ipercinetiche. Tale patologia si presenta con caratteristiche quali ereditarietà, còrea (dal greco, danza), demenza e morte del paziente 15-20 anni dopo l'insorgenza dei primi sintomi. L'età d'esordio si colloca attorno ai 40-50 anni.

### **Patogenesi**

- La distruzione di una parte specifica del sistema extrapiramidale (soprattutto il nucleo caudato) significa anche la distruzione di neuroni GABA-ergici i quali sono neuroni inibitori causando così movimenti ipercinetiche.
- Dal punto di vista genetico è stato individuato il gene (sul braccio corto di cromosoma 4 in posizione 16.3) per la proteina denominata "**huntingtina**" (**Htt**) la cui funzione è stata recentemente identificata. Essa fungerebbe da acceleratore del complesso della Dineina, e la sua mutazione va a limitare se non annullare questo effetto propulsivo, sebbene non sia stato possibile comprendere a fondo come l'elevato numero di Glutammine incida su questa deficienza.

Ciò che invece sembra certo è il composto proteico maggiormente incisivo sulla neurodegenerazione, ossia il BDNF (Brain Derived Neuronic Factor) che è un composto che mantiene in vita i neuroni evitandone l'apoptosi. Il suo trasferimento dalla corteccia alla zona dello striatum per esempio, non può che avvenire tramite il trasporto assonico, perciò se intercorre una mutazione dell'Htt, tale fattore non arriva a destinazione e causa in breve tempo sia accumulo di materiale proteico che conseguente morte cellulare.

- Tutti i pazienti affetti dal morbo di Huntington presentano una mutazione del gene per l'Htt, situato come detto sul braccio corto del cromosoma 4. Il gene normale presenta una sequenza trinucleotidica ripetitiva CAG ripetuta da 11 a 34 volte.

- La malattia è caratterizzata dalla formazione di inclusioni intranucleari ed aggregazione proteica, l'impatto degli aggregati sulla patologia non è ancora stato chiarificato.
- Esiste la possibilità di un'insorgenza precoce (attorno ai 20 anni), nel qual caso si parla di **Morbo di Huntington giovanile**.

### Quadro clinico

- alterazioni della personalità
- irrequietezza, stati depressivi
- In seguito, si verifica una progressiva compromissione dei sistemi motori con movimenti involontari rapidi della muscolatura facciale, degli arti, dapprima brevi e distali, poi sempre più duraturi e diffusi tanto da dare luogo ad una strana "danza".
- L'andatura si fa barcollante, torsioni del tronco.
- Anche la fonazione è modificata con voce monotona o a volte parola esplosiva.
- Precocemente è compromessa anche la motilità oculare con rallentamento delle saccadi e proseguono di pari grado con apatia, irritabilità, turbe della memoria, idee deliranti a carattere persecutorio sino a stati demenziali conclamati.
- La durata media di malattia è 15-25 anni, e il decesso avviene per cause intecorrenti (soprattutto complicanze polmonari).

### Diagnosi

È prima di tutto clinica e si avvale della ricerca dell'espansione delle triplette. Le neuroimmagini possono mostrare atrofia corticale e dello striato con la dilatazione ventricolare.

### Terapia

Esistono solo farmaci sintomatici :

- tetrabenazina,
- Per le discinesie si usano antagonisti della dopamina (es. aloperidolo), nelle forme giovanili dominate da rigidità può essere utile la terapia con farmaci antiparkinsoniani.

## Atassia di Friedreich

- anomalia genetica che comporta nel tempo un progressivo danneggiamento al sistema nervoso, è la forma più comune di atassia ereditaria.
- atassia metabolica, caratterizzata dalla deficienza di una proteina, la **fratassina**, che ha il compito di smaltire i metaboliti di rifiuto dei processi energetici all'interno del mitocondrio
- trasmissione autosomica recessiva

### Sintomatologia

- **Disturbi dell' equilibrio** (difficoltà a correre, a mantenere la postura in luoghi bui ed affollati)
- **Perdita progressiva dei riflessi osteotendinei agli arti inferiori**
- **Deambulazione progressivamente impacciata**

- **Disturbi della coordinazione** (difficoltà ad allacciarsi i bottoni, a scrivere, a parlare (parola scandita), a deglutire.
- **Cardiopatìa e Diabete** (nelle forme più gravi)

### Eziologia

Tale anomalia è causata dalla mutazione di un gene, l' FXN ( la “**fratassina**”), localizzato nel cromosoma 9. All'atassia di Friedreich è associato la presenza di triplette nucleotidiche ripetute in un introne del gene.

### Terapie

L'idebenone, sostanza che elimina nel corpo i radicali liberi, diminuisce il rischio di malattia cardiovascolare, ma non esistono prove che ne migliori la funzione neurologica.

## Neurofibromatosi

- malattia ereditaria che colpisce le cellule nervose e muco-cutanee dovuta a turbe dell'istogenesi.
- È caratterizzata dalla presenza di numerosi tumori benigni fibrosi (fibromi) della pelle e del tessuto nervoso.

Si distinguono 2 tipi:

1. malattia di von Recklinghausen
2. tipo 2 che è molto più rara e colpisce anche i nervi ottici, uditivi e il cervello.

Le due forme sono caratterizzate da ereditarietà autosomica dominante. Uno dei sintomi della malattia sono delle macchie di color caffèlatte sulla superficie cutanea.

- **Diagnosi** : sospettata sin dai primi anni di vita per la presenza sulla pelle di almeno 6 macchie color caffè-latte. Con il passare del tempo compaiono i neurofibromi, nella forma di noduli localizzati in varie parti del corpo. Nel 20% dei casi si associano : **tumori cerebrali ed extracerebrali - in particolare del nervo ottico, del surrene, delle ossa - scoliosi, convulsioni, ritardo mentale, ipertensione, bassa statura, pubertà anticipata ecc.**), mentre il 30-40% dei soggetti presenta dei disturbi di apprendimento (**scarsa memoria o concentrazione, difficoltà di lettura, di scrittura o di linguaggio**)
- **Terapia**
  - asportazione dei fibromi (spesso ricrescono dopo pochi mesi)
  - chemioterapia e radioterapia.

**La NF2** è meno frequente, ha le stesse caratteristiche di ereditarietà, ma è più grave per la costante presenza di tumori che colpiscono il nervo acustico (neurinomi), di uno o di entrambi i lati, e/o un'altra parte del cervello o del midollo spinale.

A seconda della localizzazione possono essere presenti sordità e/o altri seri disturbi neurologici che iniziano a manifestarsi verso i 20 anni di vita o anche più tardivamente. Numerosi pazienti

presentano inoltre una sorta di cataratta (opacità sottocapsulare posteriore giovanile) causa di grave danno della vista, e un numero variabile di macchie caffè-latte e di neurofibromi.

- Recente è la scoperta che il gene, sia per la NF1 che per la NF2, è posizionato sul cromosoma 17, ed è dovuto ad una **traslocazione** genica. Il che consente la **diagnosi prenatale** dei casi familiari.

## **Sindrome di Marfan**

- patologia autosomica dominante che colpisce il tessuto connettivo. Le manifestazioni della sindrome di Marfan interessano il sistema scheletrico, gli occhi, il cuore e i vasi sanguigni, i polmoni e le membrane fibrose che ricoprono il cervello e la spina dorsale.
- Per alcuni pazienti la diagnosi è immediata e precoce, per altri è difficoltosa, per cui solo un'indagine genetica può garantire una diagnosi precisa.
- Per un individuo colpito da sindrome di Marfan l'occorrenza di una dissecazione dell'aorta non è rara.

## **Sindrome di Ehlers-Danlos**

- raccorpa una serie di patologie ereditarie contraddistinte da lassità dei legamenti e iperelasticità della cute. Tale sindrome, infatti, colpisce prevalentemente il tessuto connettivo, con la presenza di un collagene mutato.

**Sono riconosciuti sei tipi differenti:**

- Classica (riconosciuta come tipo I e tipo II, rispettivamente gravis e mitis)
  - Ipermobilità (o tipo III ipermobile)
  - Vascolare (o tipo IV arterioso o ecchimotico)
  - Cifoscoliosi (o VI tipo oculare o scoliotico)
  - Artroclasia (in passato incluso nel tipo VII, come VIIA e VIIB)
  - Dermatosparassi (anch'esso precedentemente incluso nel tipo VII, come VIIC).Eziologia
- Per la maggior parte delle tipologie, la sindrome di Ehlers-Danlos è causata da un difetto nella sintesi di un collagene. Ad eccezione del tipo Cifoscoliosi, che ha carattere autosomico recessivo, gli altri sono dominanti.

### ***Tipo "Classica"***

anormalità del collagene di tipo V, codificato dai geni COL5A1 e COL5A2. Si manifesta con iperestensibilità cutanea, cicatrici sottili ed estese, ipermobilità articolare. Altri sintomi possibili sono: pelle traslucida e morbida al tatto, pseudotumori molluscoidi, complicazioni da lassità articolare, ipotonia muscolare, lividi all'occorrenza di traumi minimi con la tipica forma a carta di sigaretta, manifestazioni conseguenti all'iperestensibilità dei tessuti (ernia, insufficienza cervicale, ecc.). Un terzo dei pazienti manifesta dilatazione della radice aortica

### ***Tipo “Ipermobilità”***

Dovuta ad un’alterazione ancora non identificata in un collagene. I sintomi sono: **ipermobilità diffusa delle articolazioni, iperestensibilità della cute, lussazioni, dolore cronico ad arti e giunture, disturbi cardiaci** quale prollasso della valvola mitralica, mancanza del frenulo labiale e linguale, **dilatazione della radice aortica**.

### ***Tipo “Vascolare”***

Difetti strutturali del collagene III codificata dal gene COL3A1. I segnali caratteristici della presenza della sindrome sono: **fragilità delle pareti dei vasi sanguigni**, emorragia epatiche, intestinali, uterine, lividi frequenti, aspetto caratteristico del volto, ipermobilità articolare, talismo, vene varicose.

### ***Tipo “Cifoscoliosi”***

Si manifesta per mancanza dell’enzima lisil idrossilasi, responsabile della modificazione di un collagene nel gene PLOD1. I pazienti affetti manifestano lassità articolare, sclerosi progressiva congenita, ipotonia muscolare grave in età prepuberale, fragilità della sclera oculare. Possibili anche fragilità dei tessuti, lividi, fragilità dei vasi, microcomea, osteopenia scheletrica ai raggi x.

### ***Tipo “Artroclasia”***

Imputabile alla mancanza di una catena del collagene tipo due, dovuta al passaggio di un exone 6 nel gene COL1A1 o COL1A2. Presenta ipermobilità articolare generalizzata grave con lussazioni, dislocazione congenita bilaterale delle anche, fragilità dei tessuti, ipotonia muscolare, cifoscoliosi, osteopenia scheletrica.

### ***Tipo “Dermatosparassi”***

E’ causata da mancanza del procollagene 1 N-terminal peptidase nel collagene di tipo 1 nel gene ADAMST2. I sintomi sono: fragilità della cute, incurvamento, pelle in eccesso che si presenta molle e soffice, lividi. Rottura prematura della membrana fetale, ernie.

### ***Diagnosi***

- **Storia clinica familiare** del paziente
- **Test genetici**.
- **Test delle urine**.

E’ disponibile un test che aiuta ad identificare il tipo “Cifoscoliosi”. Il test misura il livello di un enzima prodotto dalla mutazione di un gene.

- Biopsia ( per rilevare eventuali anomalie nelle fibre di collagene).

Il tipo “Vascolare” viene generalmente riconosciuto tramite biopsia della pelle.

- Ecodoppler ed Ecocardio.

- Test diagnostici prenatali (Il tipo “Cifoscoliosi” e “Vascolare” possono essere rilevati tramite amniocentesi, prelevando un campione di liquido amniotico, per valutare i livelli di attività enzimatica).

### ***Rischi, Precauzioni e Trattamento***

- Evitare sollevamenti ripetuti e trasporto di oggetti pesanti
- Per lacerazioni o ferite con conseguente emorragia, è necessario prestare particolare cura alle suture e sostituirle quando possibile con l’uso di strisce adesive e colle
- Controlli cardiologici
- Alte dosi di acido ascorbico
- Consultazione di un oftalmologo (talvolta sono presenti miopia, distacco retinico, cheratoconus)
- Visita dentistica ( per frequente periodontite)

### **Miopia tipo Bethlem**

- La miopia di Bethlem, o miopia benigna autosomica dominante, è una forma di distrofia muscolare a progressione
- Le caratteristiche cliniche non si differenziano molto da quelle osservate nelle altre forme di distrofia muscolare progressiva, fatta eccezione per le contratture delle dita, che sono caratteristiche e importanti per la diagnosi differenziale.
- La malattia è causata da mutazioni in una delle tre subunità del collagene di tipo VI. Le indagini molecolari sono comunque complicate dalle dimensioni e dal tipo di espressione di questi geni.
- Il trattamento è al momento strettamente sintomatologico.

#### Segni clinici

- Molto frequente
  - Rigidità articolare
  - Camptodattilia delle dita
  - Miopia
  - E.M.G. anomalo
  - Muscolo istologicamente anomalo
  - Magrezza (diverso da lipodistrofia)
  - Eredità autosomica dominante

### **Malattia di Ullrich**

#### **Che cos'è e come si manifesta?**

La distrofia congenita di Ullrich è una forma grave di distrofia muscolare; si manifesta alla nascita con debolezza e contratture muscolari soprattutto del tronco e degli arti, che rendono impossibile camminare. Altri segni caratteristici sono la retrazioni dei muscoli prossimali (quelli più vicini al tronco) e iperlassità (iper mobilità) delle articolazioni distali, in particolare quelle delle dita delle mani. La malattia porta a un coinvolgimento precoce e progressivo dei muscoli respiratori e del diaframma, per cui spesso i bambini colpiti hanno bisogno di ventilazione meccanica già a partire dai 10 anni. La distrofia di Ullrich dipende da alterazioni negli stessi geni coinvolti anche nella miopia di Bethlem: le due malattie, quindi, sono varianti della stessa patologia. Sono entrambe molto rare.

## Come si trasmette?

I geni che, se alterati, sono responsabili della distrofia di Ullrich sono tre (COL6A1, COL6A2 e COL6A3), tutti codificanti per componenti diverse di una stessa proteina, il collagene di tipo VI, che è ancora le fibre muscolari alla matrice extracellulare, la struttura che circonda e supporta le cellule. Il meccanismo alla base della malattia risiede nei mitocondri, le "centrali energetiche" cellulari. L'assenza di collagene VI manda un segnale di "corto circuito" ai mitocondri, che cominciano a bruciare energia anziché produrne, danneggiando così le fibre muscolari, fino a portarle all'autodistruzione. La malattia si trasmette con modalità autosomica recessiva: i genitori sono portatori sani e hanno il 25% di probabilità di trasmettere la malattia a ciascuno dei figli. Esistono tuttavia anche casi di insorgenza sporadica, in cui non sono coinvolti altri membri della famiglia.

## Come avviene la diagnosi?

La diagnosi si basa sull'osservazione clinica; può avvalersi dell'esito della biopsia muscolare e di esami strumentali come la risonanza magnetica. È confermata dall'analisi genetica, con ricerca di mutazioni nei geni coinvolti.

## Quali sono le possibilità di cura attualmente disponibili?

Non esiste al momento una cura risolutiva, ma sono possibili solo trattamenti sintomatici. È allo studio la possibilità di avviare una sperimentazione clinica su una sostanza, la ciclosporina A, che ha dato buoni risultati in test sugli animali e in un primo studio pilota condotto però su pochissimi pazienti. In alcuni di questi si è osservato un incoraggiante aumento della rigenerazione muscolare. Tuttavia è ancora presto per dire se il farmaco funzionerà davvero.

## Retinoblastoma

- patologia oculare, e rappresenta il tumore maligno con maggiore diffusione in età pediatrica.

### Eziologia e sintomatologia

- Colpisce di solito la retina ad un occhio o ad entrambi.
- Esistono due tipi di patologia: il retinoblastoma ereditario e quello sporadico.

Il primo, si manifesta nel 40% dei casi ed è dovuto all'eredità di un allele mutato da un genitore, per cui gli individui colpiti sviluppano la patologia in tempi più brevi e nella forma bilaterale. Il secondo, invece, si manifesta nel 60% dei casi e non è influenzato da alcuna componente genetica, colpisce solitamente un solo occhio e il suo decorso è generalmente più lento rispetto al retinoblastoma ereditario.

- La **sintomatologia** si presenta generalmente entro i primi 5 anni di vita; il segno principale è un riflesso biancastro del fondo oculare, detto leucocoria, dovuto alla massa tumorale retinica che occupa il corpo vitreo, correlata spesso a deviazione degli assi oculari (dovuta alla perdita di fissazione dell'occhio affetto). Se il retinoblastoma non viene curato, la dimensione dell'occhio aumenta e il tumore inferisce su altre parti del corpo.

### **Terapie disponibili**

- **Trattamenti locali:** laser fotocoagulazione, crioterapia, termoterapia transpupillare e brachiterapia (applicazione di placche radioattive)
- **Chemioterapia per via sistemica**
- **Chemioterapia per via arteriosa** (attraverso l'arteria oftalmica).
- **Rimozione chirurgica del bulbo oculare malato** ( nelle forme più avanzate)

### **Sordità ereditaria -**

La **sordità** può essere determinata da fattori genetici ed ambientali. o all'uso di farmaci tossici per l'orecchio (ototossici).

La sordità può essere l'unico sintomo presente (**forme non sindromiche**) o accompagnarsi ad altri segni e sintomi (**forme sindromiche**). La maggior parte delle forme non sindromiche è dovuta a cause genetiche. Nella sordità sindromica sono presenti altri segni e/o sintomi che definiscono alcuni quadri abbastanza comuni quali la sindrome di Alport, la sindrome di Waardenburg, la sindrome di Usher e la sindrome di Pendred, oltre ad altre meno frequenti.

Esistono molte forme di sordità genetica con diverse modalità di trasmissione:

- **autosomica recessiva** in circa il **75%** dei casi;
- **autosomica dominante** in circa il **20%**;
- **legata al cromosoma X** in circa il **5%**;
- **mitocondriale** in meno dell'**1%**.

I geni o le regioni cromosomiche (loci) associate alle varie forme di sordità genetica non sindromica sono indicati con la sigla **DFN**, dall'inglese **DeaFNness**:

- **DFNA** per le forme ad eredità **autosomica dominante**, Il gene **COCH** è probabilmente il gene più frequentemente coinvolto in questi casi di sordità
- **DFNB** per le forme ad eredità **autosomica recessiva**; Il gene **connessina 26** , è il responsabile di circa l'**80%** dei casi di queste sordità.

Le connessine sono una famiglia di proteine presenti sulla membrana cellulare, dove formano dei canali necessari per gli scambi e la comunicazione tra cellule.

- **DFN** per le forme ad eredità recessiva legata al **cromosoma X** (gene **POU3F4** )
- Il gene **12S rRNA** non si trova sui cromosomi ma è contenuto nel DNA dei mitocondri. E' responsabile della forma più frequente di sordità ad eredità mitocondriale.

Sono stati finora identificati 19 geni responsabili di diverse forme di sordità ereditaria.

Oltre alla valutazione clinica e strumentale, il medico può utilizzare l'analisi molecolare come conferma diagnostica nei casi in cui il gene responsabile della forma di sordità in questione sia noto.

L'**analisi molecolare** permette di analizzare il DNA alla ricerca di mutazioni nei geni noti.

L'analisi molecolare si può inoltre eseguire nei familiari delle persone affette al fine di

identificare i portatori sani della mutazione.

Dato che non tutti i geni responsabili delle numerose forme di sordità ereditaria sono stati identificati, non sempre l'analisi molecolare permette di identificare l'alterazione che causa la malattia.

## **Malattie metaboliche ereditarie**

Le **malattie metaboliche ereditarie**, definite anche errori congeniti del metabolismo, sono un gruppo di malattie genetiche causate dal deficit parziale o totale di una specifica attività enzimatica o di una proteina che ha la funzione di trasportare specifici composti attraverso le membrane cellulari.

La via metabolica, quindi, rallenta o si blocca a livello dell'enzima carente. Le conseguenze, in generale sono:

- **Accumulo** dei composti (metaboliti) a monte del difetto
- Il **prodotto** finale della via metabolica **scarseggia o è assente**
- l'organismo **attiva vie metaboliche** "collaterali" che a volte aggirano in parte il blocco, a volte no.

Per alcune malattie metaboliche il **danno è dovuto** principalmente alla **carenza di un prodotto** importante che non viene più sintetizzato; per altre invece **all'accumulo di metaboliti** che risultano tossici, oppure per **entrambi i meccanismi**.

**Il tipo di sintomi e gli organi colpiti** variano in funzione del tipo di carenza enzimatica: ogni malattia metabolica ereditaria ha quindi caratteristiche cliniche diverse.

Le malattie metaboliche "classiche" si possono classificare in base al tipo di composti che non vengono metabolizzati o in riferimento alla localizzazione del difetto all'interno della cellula.

Possiamo distinguere così alcuni grandi gruppi di malattie metaboliche (in parentesi vengono indicate alcune delle malattie, più note o più frequenti):

1. **Malattie del metabolismo e del trasporto degli aminoacidi** (es. fenilchetonuria, omocistinuria, la maggior parte delle acidurie organiche, difetti del ciclo dell'urea, cistinuria)
2. **Malattie del metabolismo dei carboidrati** (es. glicogenosi, galattosemia, intolleranza ereditaria al fruttosio)
3. **Malattie del metabolismo lipidico** (es. ipercolesterolemia familiare e altre dislipidemie)

## **Malattie del metabolismo e del trasporto degli aminoacidi**

### **Fenilchetonuria**

- In individui normali la fenilalanina idrossilasi di origine epatica catalizza la conversione della fenilalanina in un aminoacido molto simile, la tirosina.
- Esistono individui privi di questo enzima a causa di un gene autosomico recessivo, e poiché non possono trasformare regolarmente la fenilalanina, si accumulano grandi concentrazioni di questo aminoacido nel sangue, nel liquido cerebro-spinale e nell'urina.
- Nelle persone normali, parte della fenilalanina viene trasformata in acido fenilpiruvico, mentre nelle persone prive di fenilalanina idrossilasi si **produce un'eccessiva quantità di acido fenilpiruvico, che viene escreto nell'urina**. Questa condizione è stata scoperta per la presenza nell'urina del chetoacido fenilpiruvico, per cui è nota come fenilchetonuria, o PKU.
- Molti fenilchetonurici presentano microcefalia con grave deficienza mentale, pelle e capelli chiari.

- Attraverso screening genetici si può giungere a una diagnosi precoce, prevenendo in modo soddisfacente le gravi alterazioni neurologiche attraverso un ridotto apporto dietetico di fenilalanina.
- Terapia:dieta(fenilalanina è presente in molte fonti proteiche)

## Alcaptonuria.

- La presenza di un solo gene autosomico recessivo *al* permette la presenza nel sangue di un enzima, l'omogentisinico ossidasi che accelera la scissione di un prodotto normale del metabolismo, l'acido omogentisinico, detto anche alcaptone, metabolita della tirosina.
- Negli alcaptonurici l'omozigosi per *al* è responsabile dell'assenza di questo enzima, e l'acido omogentisinico, invece di essere degradato ad acido maleilacetoacetico e di essere alla fine degradato in anidride carbonica e acqua, è escreto nell'urina. Poiché l'alcaptone è una sostanza che si scurisce se esposta all'aria, i pannolini dei bambini alcaptonurici, e le urine delle persone affette, diventano neri in seguito a prolungato contatto con l'atmosfera.
- . Il blocco dell'enzima porta a un'assenza del prodotto di degradazione dell'acido omogentisinico, cioè dell'acido maleilacetoacetico
  - l'accumulo dell'acido omogentisinico stesso.
- . Ciò nonostante, la mancata ossidazione dell'alcaptone porta gradualmente a una pigmentazione scura delle cartilagini e di altre parti del corpo, che si nota nei padiglioni auricolari, nella sclera e in altri tessuti cartilaginei e connettivi, determinando così l'ocronosi. L'artrite secondaria, talora causa d'invalidità, è l'ultima conseguenza dell'anomalia genetica.

## Omocistinuria

L'omocistinuria classica da deficit di cistationina beta-sintetasi (Cbs) è una malattia multisistemica, caratterizzata dal coinvolgimento degli occhi, dello scheletro, del sistema nervoso e dell'apparato vascolare. In base ai dati raccolti in diversi paesi, relativi ad oltre 200.000 neonati, il tasso di rilevazione cumulativo del deficit di Cbs è 1: 344.000. In alcune aree, l'incidenza stimata in base ai casi clinici è circa 1:65.000. Più recentemente, lo screening delle mutazioni di Cbs ha dimostrato un'incidenza più alta, pari a 1:20.000. I pazienti sono normali alla nascita; in assenza di terapia, il decorso della malattia è progressivo. Le anomalie oculari comprendono l'ectopia del cristallino (85% dei casi), associata ad una elevata miopia. Le alterazioni scheletriche comprendono il genu valgum e i piedi cavi, la dolicoostenomelia, il pectus excavatum o carinatum, la cifosi o scoliosi e l'osteoporosi. Le complicazioni tromboemboliche, che colpiscono le piccole e le grandi arterie e le vene costituiscono la principale causa di morbidità e di mortalità. Il deficit cognitivo si manifesta raramente prima del primo-secondo anno di vita. Nel 51% dei casi è stata riscontrata una malattia psichiatrica significativa dal punto di vista clinico. Può essere presente un coinvolgimento epatico, cutaneo e dei capelli. La malattia viene trasmessa con modalità autosomica recessiva, coinvolge il metabolismo della metionina ed è dovuta a mutazioni del gene CBS (21q22.3). La Cbs normalmente trasforma l'omocisteina in cistationina nella via della transulfurazione del ciclo della metionina e necessita di piridossal 5-fosfato come cofattore. Gli altri due fattori implicati nella rimetilazione della metionina sono la vitamina B12 e l'acido follico. La diagnosi clinica del deficit di Cbs viene confermata attraverso l'esame degli aminoacidi nel sangue (compresa la misurazione dell'omocisteina totale), la misurazione dell'attività enzimatica della Cbs e lo screening delle mutazioni di CBS. Se la malattia viene diagnosticata nel periodo neonatale, come sarebbe

auspicabile, l'obiettivo del trattamento è quello di assicurare lo sviluppo di un'intelligenza normale e di prevenire altre complicazioni. In epoca successiva, il trattamento mira a prevenire le complicazioni, in particolare quelle tromboemboliche che mettono a rischio la vita del paziente. Attualmente sono disponibili tre tipi di trattamento. Per i pazienti che rispondono alla piridossina, il trattamento prevede la piridossina in dosi farmacologiche, in associazione con la supplementazione di acido follico e vitamina B12. Nei pazienti che non rispondono alla piridossina, il trattamento raccomandato prevede una dieta povera di metionina e ricca di cistina, in associazione con la supplementazione di piridossina, acido follico e vitamina B12. La betaina anidra è un donatore di metile, in grado di abbassare i livelli di omocisteina nei pazienti; per questo può essere considerata un complemento alla dieta. Nel 2007 la betaina anidra ha ottenuto dall'UE l'autorizzazione alla commercializzazione come farmaco orfano per il trattamento della omocistinuria.

## **Malattie del metabolismo dei carboidrati**

- **la galattosemia**, nella quale i bambini accumulano composti del galattosio in grado di provocare danni al fegato e difetti mentali poco tempo dopo la nascita per mancanza dell'enzima che converte il galattosio del latte in glucosio. Mancanza dell'enzima galattosio 1 fosfatouridiltransferasi ciò comporta l'accumulo nel corpo di galattosio1fosfato a livelli tossici

### **Sintomatologia:**

- disidratazione
- mancanza di appetito
- itterizia, cataratta
- ritardo mentale con decorso progressivo fatale

**Terapia:** Dieta priva di galattosio, ma non previene le complicanze a lungo termine

La galattosemia è un esempio di allelia multipla, infatti è noto un terzo allele GD e gli individui con quest'allele non manifestano nessuna sintomatologia

- **la glicogenosi di tipo I**, morbo di von Gierke, porta a una malattia da accumulo di glicogeno, normalmente immagazzinato in quantità moderate nel fegato e nei reni, ove forma la principale riserva di questo materiale energetico facilmente trasformabile in glucosio sotto il controllo della glucosio-6-fosfatasi. Alcuni individui mancano di quest'enzima, presentando una bassa concentrazione di zucchero nel sangue e accumulo di enormi quantità di glicogeno nel fegato e, in misura lievemente minore, nei reni. Di solito questa condizione porta a morte durante l'infanzia. È trasmessa per via autosomica recessiva
- **la glicogenosi di tipo II**, morbo di Pompe, in cui manca l'enzima  $\alpha$ -1,4-glucosidasi e nella quale, oltre all'accumulo di glicogeno, si riscontrano dei lisosomi anormali. La forma infantile causa morte precoce. Trasmissione AR

- **la glicogenosi di tipo III** ,Sindrome di Forbes ,Sindrome di Cori,mancanza dell'enzima amilo1,6-glicosidasi,trasmissione AR,accumulo di glicogeno nei muscoli e nel fegato,lieve ingrossamento del fegato,anomalie renali
- **la glicogenosi di tipo IV** o Amilopectinosi o Sindrome di Andersen,mancanza dell'enzima amilo1,4-transglucosidasi.Trasmissione AR,cirrosi epatica,possibile insufficienza epatica,morte

## **Intolleranza al fruttosio**

### **Riassunto**

L'intolleranza ereditaria al fruttosio è una malattia autosomica recessiva dovuta al deficit dell'attività del fruttosio-1-fosfato aldolasi, che comporta un accumulo di fruttosio-1-fosfato nel fegato, nel rene e nel piccolo intestino. I neonati omozigoti godono di buona salute fino a quando non assumono alimenti ricchi in fruttosio, di solito al momento dello svezzamento, quando la dieta viene integrata con fruttosio e saccarosio. I segni clinici comprendono il dolore addominale acuto, il vomito e l'ipoglicemia successivamente all'ingestione di fruttosio o di altri zuccheri metabolizzati attraverso il fruttosio-1-fosfato. L'ingestione protratta di fruttosio nei bambini esita in insufficienza epatica e/o renale e può condurre alla morte. I pazienti sviluppano una forte avversione per i cibi dolci. La malattia ha una prevalenza di 1 su 20.000 in alcuni Paesi Europei. Il difetto genetico è nell'aldolasi B, che catalizza la scissione di fruttosio-1-fosfato per formare diidrossiacetone fosfato e D-gliceraldeide. La malattia può essere geneticamente eterogenea: possono essere presenti sia mutazioni strutturali che nelle regioni di controllo, o anche mutazioni strutturali diverse. La diagnosi si basa sul test enzimatico su biopsia epatica, per saggiare l'attività dell'aldolasi, oppure sul test di tolleranza al fruttosio: il fruttosio viene iniettato per via endovenosa controllata, mentre sono contestualmente monitorati i livelli di glucosio, fruttosio e fosfato.

## **Malattie del metabolismo lipidico**

- **ipercolesterolemia familiare**:patologa caratterizzata da mutazioni a carico dei recettori,in particolare è alterato o assente il recettore per le LDL,la trasmissione è autosomica dominante.Il fenotipo è caratterizzato da:elevati livelli di colesterolo nel sangue,arteriosclerosi,infarto,morte precoce

**Clinica:** è caratterizzata clinicamente da

1. un'elevata concentrazione di LDL plasmatiche;
2. depositi di colesterolo derivato dalle LDL nei tendini e nella cute (xantomi) e nelle arterie (ateromi)
3. trasmissione ereditaria come un tratto autosomico dominante con effetto gene-dosaggio, cioè a dire gli omozigoti sono affetti da una forma molto più severa di quanto non lo siano gli eterozigoti

**Terapia:** Dieta e valutazione di altri fattori di rischio

**farmacologica:** statine ,resine a scambio ionico (colestiramina e il colestipolo), acido nicotinico fibrati (clofibrato)

## Gangliosidosi

### Riassunto

La gangliosidosi GM1 è una malattia neurodegenerativa, caratterizzata dall'accumulo di gangliosidi GM1. Si distinguono tre forme di gangliosidosi GM1. La forma infantile (tipo I) esordisce prima dei 3 mesi di vita, con encefalopatia progressiva e amaurosi. All'esordio, compaiono epato-splenomegalia, infiltrazione cutaneo-mucosa (che conferisce al viso l'aspetto grossolano) e deformazioni scheletriche (compresa la cifoscoliosi). Durante i primi sei mesi di vita si manifesta un ritardo o un arresto dello sviluppo, seguito da un deterioramento neurologico progressivo. Nel 50% dei casi la macula presenta macchie rosso-ciliegia. I livelli degli oligosaccaridi urinari sono elevati. La forma giovanile (tipo II) esordisce tra 1 e 5 anni di età. Il sintomo principale è l'ataxia locomotoria, che esita in uno stato di decerebrazione, con crisi epilettiche. I visceri sono coinvolti solo in maniera lieve. Nella forme dell'adulto (tipo III o gangliosidosi GM1 cronica), l'esordio può essere variabile, occasionalmente in età giovanile, ma la diagnosi non viene posta prima dell'età adulta. I segni clinici sono simili a quelli delle forme giovanili della malattia di Parkinson, della degenerazione spino-cerebellare atipica o della distonia. I visceri non sono coinvolti e non si riscontra la macchie rosso-ciliegia a livello della macula. Il deficit cognitivo può inizialmente mancare o essere di lieve entità, ma con il tempo progredisce. La gangliosidosi GM1 è causata da un deficit dell'enzima lisosomiale beta-galattosidasi (beta-gal). Si trasmette come carattere autosomico recessivo. Il gene-malattia è localizzato sul cromosoma 3p21-p33. E' stata identificata una dozzina di mutazioni, che impediscono la fosforilazione del precursore della beta-galattosidasi che, di conseguenza, viene secreto, anziché essere trasferito ai lisosomi. Il deficit di beta-galattosidasi e l'accumulo di GM1 sembrano indurre l'attivazione indiretta di una via di apoptosi neuronale. La diagnosi può essere confermata con la biopsia cutanea, che dimostra una notevole riduzione dell'attività enzimatica della beta-galattosidasi sulle colture di fibroblasti, come nei leucociti. E' possibile lo screening degli eterozigoti e la diagnosi prenatale. La prognosi dipende dall'età di esordio della gangliosidosi. Le attese di vita non superano i 2 anni nella forma infantile e, raramente, i 20 anni nella forma giovanile. Nella gangliosidosi dell'adulto, il fenotipo è variabile, ma i danni neurologici progressivi, di solito, riducono le attese di vita. E' in corso la sperimentazione una terapia rivolta alle forme lentamente progressive, che impedisce la sintesi dei gangliosidi (Miglustat).

## Malattia di Gaucher

### Riassunto

La malattia di Gaucher è una patologia da accumulo lisosomiale secondaria al deficit di glucocerebrosidasi (definita anche glucosilceramidasi o glucosidasi beta acida) o, in alcuni casi, al deficit dell'attivatore proteico della saposina C. La malattia è caratterizzata dalla presenza di depositi di glucosilceramidi (o glucocerebrosidi) nelle cellule reticolo-endoteliali del fegato, della milza e del midollo osseo. L'incidenza della malattia nella popolazione generale è circa 1: 60.000, ma tra gli ebrei Ashkenazi è più alta (1: 1.000). La prevalenza è circa 1: 100.000. La sintomatologia clinica è estremamente variabile. Di solito si distinguono tre fenotipi principali. Il tipo 1 è la forma cronica e non neurologica, che rappresenta il 95% dei casi. Si tratta di una malattia eterogenea,

caratterizzata dall'associazione tra organomegalia (milza, fegato), patologia scheletrica (dolore, infarti ossei, osteonecrosi) e citopenia (trombocitopenia, anemia e, raramente, neutropenia). L'attività di alcuni marcatori biologici è aumentata – compresi la chitotriosidasi (un enzima di conversione dell'angiotensina), la ferritina e la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP). Il tipo 2 è la forma neurologica acuta, caratterizzata da una disfunzione del tronco cerebrale ad esordio precoce (durante il primo anno di vita), a rapida evoluzione e con organomegalia. Il tipo 3 è la forma neurologica subacuta ed è caratterizzata da un'encefalopatia progressiva (aprassia oculomotoria, epilessia e atassia), associata ai sintomi presenti nella malattia di tipo 1, ma ad esordio nell'infanzia o nell'adolescenza. L'encefalopatia può essere il primo sintomo oppure può insorgere più tardivamente, nel corso della malattia. È stata osservata anche una forma perinatale letale, caratterizzata dall'assenza o dalla diminuzione dei movimenti fetali o da anasarca. La malattia di Gaucher è trasmessa come carattere autosomico recessivo ed è dovuta alle mutazioni del gene GBA (1q21). La diagnosi può essere confermata attraverso la misurazione dei livelli della glucocerebrosidasi nei leucociti del sangue. Al momento sono disponibili sul mercato due trattamenti specifici, anche se la terapia sostitutiva enzimatica, che utilizza l'analogo imiglucerasi, resta la terapia di elezione ed è indicata per i pazienti affetti dalla malattia di tipo 1 e 3. La terapia basata sulla diminuzione del substrato, che utilizza il miglustat, rappresenta un trattamento di seconda scelta. È importante che i pazienti siano trattati prima della comparsa delle sequele che non rispondono a queste terapie.

## **Malattia di Fabry**

### **Riassunto**

La malattia di Fabry è una malattia ereditaria del metabolismo dei glicosfingolipidi, a trasmissione recessiva legata all'X, dovuta a un deficit di un enzima lisosomiale, l'alfa-galattosidasi A. Il difetto enzimatico determina l'accumulo di un substrato non degradato nei tessuti e nel plasma. Nella sua forma classica, la malattia colpisce più gravemente i maschi emizigoti, nei quali i segni clinici insorgono nell'infanzia, con dolori alle estremità e segni dermatologici (angiocheratomi). Successivamente, si sviluppa una malattia da sovraccarico multiviscerale, con sintomi cardiaci (ipertrofia ventricolare sinistra), neurologici (accidenti vascolari cerebrali), otorinolaringoiatrici (ipoacusia) e renali (proteinuria, insufficienza renale). Sono state recentemente descritte anche forme varianti, i cui sintomi sono limitati al cuore o ai reni. Le donne eterozigoti, portatrici della malattia, sono spesso sintomatiche, ma in modo più variabile e generalmente più lieve, rispetto agli uomini. La diagnosi è definitivamente confermata dal dosaggio dell'attività enzimatica nei maschi e dalla ricerca di mutazioni del gene GLA nelle femmine. Il gene GLA, localizzato in Xq22, è stato clonato e sono state caratterizzate oltre 200 mutazioni. Il trattamento è sintomatico, e diverse sperimentazioni cliniche hanno recentemente dimostrato l'efficacia e la buona tolleranza del trattamento enzimatico sostitutivo con enzima ricombinante, che è ormai disponibile come trattamento specifico per la malattia di Fabry.

## **Malattia di Niemann-Pick**

### **Riassunto**

La malattia di Niemann-Pick è una malattia lisosomiale, a trasmissione autosomica recessiva, dovuta al deficit dell'attività della sfingomielinasi acida, l'enzima che idrolizza la sfingomielina in ceramide. Questo difetto è responsabile del sovraccarico delle cellule di sfingomielina. In rapporto al quadro clinico, si distinguono due tipi di malattia di Niemann-Pick: tipo A (frequenza in Francia pari a circa 1/500.000) e tipo B (frequenza in Francia pari a circa 1/200.000). Il tipo A ha un esordio

nel primo anno di vita, con disturbi della digestione, alterazione dello stato generale, epatosplenomegalia importante e grave interessamento neurologico (arresto dello sviluppo psicomotorio, ipotonia). Il coinvolgimento neurologico e le infezioni polmonari portano rapidamente alla morte. Nelle forme di tipo B, l'età di insorgenza è molto variabile (fino all'età adulta) e il segno più costante è l'epatosplenomegalia, talvolta associata a segni polmonari. La diagnosi viene confermata con il dosaggio dell'attività della sfingomielinasi acida. E' possibile la diagnosi prenatale. Attualmente non è disponibile un trattamento specifico: può essere proposta unicamente una terapia sintomatica.

## Terapia genica

Per **terapia genica**, si intende l'inserzione di materiale genetico (DNA) all'interno delle cellule al fine di poter curare delle patologie. Questa procedura di inserzione è nota come transfezione.

Si è valutata così la possibilità di trasfettare le cellule somatiche di un individuo avente una malattia genetica con un segmento di DNA contenente l'allele sano. Questo approccio si è successivamente esteso anche alle patologie non mendeliane come tumori, infezione da HIV ed altre patologie in cui non si va a sostituire un gene difettoso ma se ne aggiunge uno che possa mettere in moto un fenomeno terapeuticamente utile.

### **Tipologie di terapia genica**

Esistono due tipologie di terapia genica: quella delle **cellule germinali** e quella delle **cellule somatiche**.

La prima si propone di trasfettare le cellule della linea germinale come spermatozoi ed ovociti o le cellule staminali totipotenti dei primissimi stadi dello sviluppo dell'embrione (allo stadio di 4-8 cellule)

La seconda tipologia, invece, si propone di modificare solamente le cellule somatiche. La terapia genica delle cellule somatiche, a sua volta, viene suddivisa in due gruppi: la terapia genica **ex vivo** e quella **in vivo**.

### **La terapia genica ex vivo**

Consiste nel prelievo delle cellule somatiche della persona interessata. Successivamente vengono messe in coltura in laboratorio. Durante questo tempo vengono anche trasfettate con il gene d'interesse, inserito tramite un apposito vettore (spesso vettori virali), poi vengono reinfuse o reimpiantate nel corpo del soggetto. Tale procedura è sicuramente la più lunga e la più costosa delle due ma permette di selezionare ed amplificare le cellule d'interesse ed inoltre gode d'una maggior efficienza.

### **La terapia genica in vivo [**

Viene attuata in tutti quei casi in cui le cellule non possono essere messe in coltura, o prelevate e reimpiantate, come quelle del cervello o del cuore e della maggior parte degli organi interni.

Rappresenta un modello terapeutico con elevata compliance, è molto economico ma, attualmente, di più difficile applicazione. In questo caso il gene, o oligonucleotide d'interesse viene inserito nell'organismo, tramite un opportuno vettore, direttamente per via locale o sistemica. I sistemi attualmente studiati sono di tre tipi: lipoplessi, poliplessi, lipopoliplessi. Questi, si formano attraverso l'interazione elettrostatica tra il DNA (carico negativamente) e nanoparticelle (cariche positivamente). Le nanoparticelle possono essere rispettivamente di tipo lipidiche (liposomi cationici), o polimeriche (policationi), o un sistema supramolecolare formato da liposomi e policationi. Potenzialmente tutti i tre tipi di vettori non virali potrebbero sostituire gli attuali vettori virali e fisici.

### ***La prima tappa***

- Conoscere la fisiopatologia della malattia in questione
- Identificare gli eventuali geni alterati o coinvolti nel processo o quelli terapeutici
- Una volta individuato il gene d'interesse esso viene amplificato, clonato e sequenziato.

### ***Tipologie di trasferimento***

Una volta che il gene d'interesse viene inserito nella cellula può accadere che esso vada incontro ad integrazione nel genoma cellulare oppure che rimanga esterno formando una particella episomale.

L'integrazione nel genoma permette la replicazione del gene ed il suo trasferimento alle cellule figlie derivanti dalla duplicazione della cellula madre.

La particella episomiale, invece, non viene interessata dalla duplicazione per cui essa non viene trasmessa alle cellule figlie. È possibile ovviare a questa situazione, comunque, associando al gene terapeutico un'origine di replicazione, una sequenza di DNA che permette l'aggancio delle polimerasi cellulari, che fa sì che l'episoma venga trasmesso alle cellule figlie.

Avendo a che fare con malattie genetiche, infatti, bisogna utilizzare un gene che si replichi in maniera stabile per cui lo si deve far integrare nel genoma dell'ospite (per esempio utilizzando un retrovirus) oppure lo si può inserire sotto forma di particella episomiale contenente un'origine di replicazione.

In altri casi, invece, il gene terapeutico è necessario solo per un certo periodo di tempo per cui lo si può aggiungere sotto forma di particella episomiale priva dell'origine di replicazione.

### ***Metodologia del trasferimento genico***

I diversi sistemi utilizzati per realizzare questo processo vengono attualmente distinti in virali e non virali.

### ***Il trasferimento non virale***

- Iniezione di DNA nudo (procedura lineare e semplice che permette di trasferire costrutti genici di grandi dimensioni. Consiste nell'iniettare il gene terapeutico, legato ad un plasmide, direttamente nella cellula tramite l'utilizzo d'una micropipetta. Lo svantaggio di

questa metodica consiste nel fatto che bisogna iniettare il DNA in ogni cellula, una per una). Il rendimento, inoltre, è decisamente basso.

- Inserimento tramite liposomi
- Inserimento attraverso l'uso di polimeri cationici
- Bombardamento tramite particelle (gene gun).

Usando liposomi cationici è possibile far complessare ad essi il DNA, che a pH neutro presenta carica negativa. Il complesso DNA-liposoma può fondersi con la membrana cellulare ma nella maggior parte dei casi viene internalizzato tramite endocitosi. Successivamente il DNA viene liberato nel citoplasma, entra nel nucleo e viene espresso. Sfortunatamente questo processo è a bassa efficienza. Per ovviare a ciò nei liposomi sono state anche inserite proteine ed anticorpi che possano aumentare l'efficacia della procedura minimizzando la degradazione del DNA e facilitando il corretto direccionamento della vescicola.

Molto simile è la procedura che si applica per la transfezione che utilizza polimeri cationici, infatti polimeri dotati di molteplici cariche positive interagiscono con il DNA, che, come già detto, a pH fisiologico è un polianione, provocandone la condensazione e proteggendolo da aggressivi sia chimici che enzimatici, oltre che da radiazioni ionizzanti. Anche i complessi DNA-policatione vengono internalizzati dalla cellula per endocitosi, e possono essere attivamente indirizzati verso specifiche linee cellulari o tessuti utilizzando anticorpi o altre molecole direccionanti.

Il quarto metodo consiste nell'utilizzo di particolari strumenti elettrici o ad alta pressione, detti cannoni genici (gene gun), che permettono di inviare nella cellula particelle microscopiche d'oro o di tungsteno ricoperte da DNA.

## Il trasferimento virale

Si basa sull'utilizzo di opportuni virus ricombinanti.

I virus hanno un'ottima tendenza ad infettare le cellule ed ad inserirvi il proprio DNA sia integrandolo sia sotto forma d'episoma. Rispetto ai sistemi di trasferimento non virali, quindi, hanno un'efficienza nettamente maggiore. I virus da impiegare, tuttavia, devono godere d'alcune caratteristiche:

- le particelle virali ricombinanti, rispetto al *wild-type* (*tipo selvaggio* cioè il virus non ricombinato), devono essere difettive rispetto alla replicazione
- il virus non deve possedere alcune qualità non desiderabili (tipo produzione di composti tossici od attivazione del sistema immunitario)
- vi dev'essere spazio a sufficienza per il gene terapeutico (vincolo di dimensione).

I virus attualmente studiati quali vettori per la terapia genica sono:

- i retrovirus,
- i lentivirus,
- gli adenovirus,
- i virus adenoassociati,
- gli herpesvirus.

## **BIOLOGIA MOLECOLARE**

### **MUTAZIONI**

Il DNA è soggetto a mutazioni, cioè a cambiamenti ereditari che insorgono casualmente e che sono alla base del processo evolutivo. La conseguenza di queste mutazioni è la presenza di polimorfismi nei nostri genomi.

Le mutazioni possono essere:

- Spontanee: si verificano durante:
  - La duplicazione. In questo processo la polimerasi commette degli errori. È importante sapere in quale gene è capitata. Vengono replicate 3.000.000 di coppie di basi ad ogni divisione cellulare in un periodo di 2-3 h.
  - La combinazione.
  - La segregazione.
- Indotte: causate da mutageni, radiazioni UV e ionizzanti, calore.

Distinguiamo diversi tipi di mutazioni:

- Genomiche: hanno una frequenza di  $10^{-2}$  per ogni divisione cellulare dovuta ad un errore di segregazione (ANEUPLOIDIA).
- Cromosomiche: errore di ricombinazione (es. cromosoma 9/22).
- Geniche: errore di duplicazione (es. mutazioni puntiformi).

L'incidenza delle mutazioni dipende da diversi fattori:

- Dimensione locus.
- Capacità codificante o meno.
- Caratteristiche di sequenza.

Esistono comunque delle "zone calde" di variabilità (HOT SPOTS MUTAZIONALI) come il gene della distrofina.

## PSEUDOGENI

Sono geni che hanno un'omologia di sequenza con geni che codificano (i geni della globina hanno degli pseudo geni). Accumulano mutazioni e non hanno più alcuna funzione.

[La prof. fa un riferimento ai meccanismi di riparazione del DNA ma sugli appunti non c'è scritto nulla. Ho aggiunto io qualcosa].

## MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

Un primo meccanismo è intrinseco all'enzima che effettua la replicazione del DNA, ossia la DNA polimerasi. Durante la replicazione del DNA, ovvero il processo di copiatura del DNA che porta alla formazione di nuove "molecole-figlie", può succedere che venga incorporato un nucleotide sbagliato, che, se non rimosso, potrebbe dare origine a mutazione. Una delle DNA polimerasi che esistono all'interno delle cellule, oltre ad avere attività polimerizzante, ossia attività di sintesi di DNA, ha anche una cosiddetta attività di "correttore di bozze", che serve per rimuovere gli errori di appaiamento durante la replicazione. Se questo enzima durante la sintesi di DNA aggiunge un nucleotide errato, se ne accorge, si ferma e, prima di continuare a polimerizzare, rimuove il nucleotide errato in direzione opposta.

Questo processo assomiglia all'azione del tasto "backspace" della tastiera del computer. Le singole lettere di una parola sono inserite, una dopo l'altra, in una direzione (da sinistra a destra); se viene inserita una lettera sbagliata, con il tasto "backspace" si torna indietro (da destra a sinistra, invertendo la direzione di "polimerizzazione" delle parole), si elimina la lettera sbagliata e poi si riprende a scrivere nella direzione di "polimerizzazione" (da sinistra a destra).

Oltre a questo meccanismo di correzione immediata, vi sono poi altri meccanismi cosiddetti di riparazione dei danni al DNA, che intervengono quando la molecola di DNA subisce dei danni ad opera di agenti esterni, quali agenti chimici o fisici, tra cui i raggi X o i raggi ultravioletti (UV). Un esempio di meccanismo di riparazione dei danni al DNA è la "riparazione per escissione", che rimuove i danni causati dalla luce UV. Questo meccanismo prevede l'intervento di numerosi enzimi, che identificano il danno, lo rimuovono, risintetizzano DNA nel tratto rimasto vuoto dopo la rimozione del danno e saldano i frammenti di DNA di nuova sintesi con il resto della molecola.

Esistono malattie genetiche dovute ad alterazioni nei geni che codificano gli enzimi coinvolti nella riparazione del DNA. Una di queste malattie ereditarie è lo *Xeroderma pigmentoso*. Gli individui affetti non riescono a riparare i danni al DNA indotti dalle radiazioni UV della luce solare e hanno un altissimo rischio di sviluppare tumori multipli della cute nelle zone esposte al sole (raggi UV). Infatti, la mancata o incompleta riparazione dei danni al DNA può determinare un aumento nella frequenza di mutazione e può portare ad instabilità del genoma, predisponendo allo sviluppo di tumori.

Ritornando alle mutazioni, le mutazioni geniche si suddividono a loro volta in:

- **Mutazioni puntiformi:**
  - Sostituzione di base.
  - Tautomeria delle basi: dalla forma enolica alla chetonica in maniera spontanea.

- Modificazione delle basi per deaminazione e depurinazione.
- **Mutazioni silenti (sinonimo):** sono le più frequenti, capitano nella terza base di un codone ma non cambia nulla perché questa codifica per la stessa proteina.
- **Mutazioni missenso:** possono essere:
  - Conservative: cambiamento di un amminoacido con uno chimicamente simile e quindi ciò non causa un cambiamento fenotipico.
  - Non conservative: cambiamento di un amminoacido con un altro chimicamente diverso.

Definizione di

Cluster genico: insieme di tanti geni uno dopo l'altro con la stessa funzione ma ognuno dei quali presenta un proprio promotore e segnali per la sua espressione.

### β-TALASSEMIA

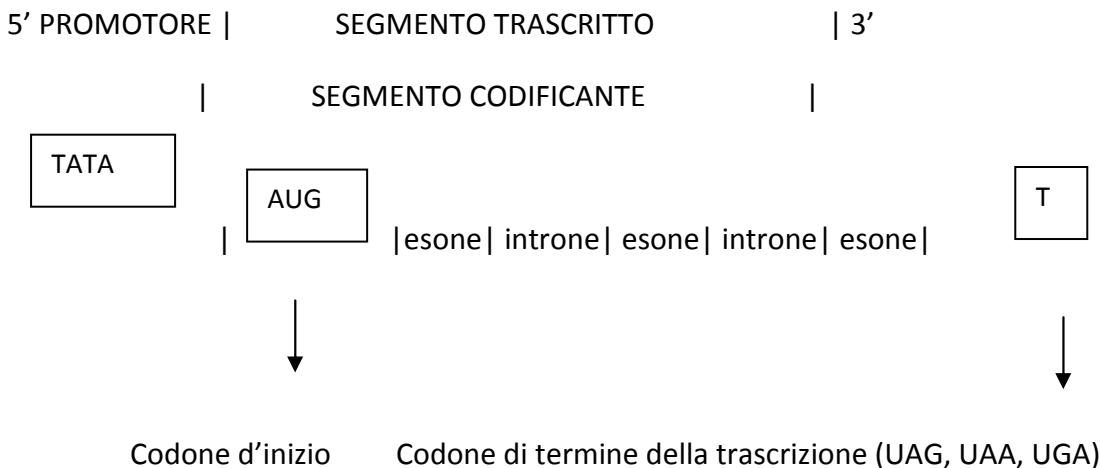
- Sul cromosoma 11 cluster del gene β: si conoscono tutte le mutazioni puntiformi, sia quelle qualitative (anemia falciforme) che quelle quantitative (β-Talassemia).
- Sul cromosoma 16 cluster gene α.

All'interno dello stesso gene le mutazioni possono verificarsi in posizioni diverse:

- Sequenze codificanti.
- Sequenze non codificanti intrageniche.
- Sequenze di regolazione esterne al gene.

Nei procarioti invece c'è un promotore a capo di tutto che il CISTRONE.

### STRUTTURA DI UN GENE



Schema del gene della globina con tutte le mutazioni fino ad ora descritte (nella maggior parte dei casi sono mutazioni puntiformi anche se sono state descritte delle delezioni).

Mutazioni puntiformi sono state descritte a livello del:

- Promotore: la RNA-polimerasi riconosce comunque TATA, altre invece le riconosce con minore efficienza, quindi verrà prodotta una minore quantità della proteina.

Poi ci possono essere mutazioni che determinano uno splicing difettoso. All'interno e alla fine di un introne ci sono dei nucleotidi AGGG che quando cambia si determina che la giunzione non avviene correttamente e quindi l'introne non viene rimosso, dunque la proteina funzionante sarà ridotta.

Nella  $\beta$ -Talassemia la mutazione è dovuta al fatto che viene creato un sito di splicing alternativo. La mutazione più frequente in Sardegna è una sostituzione a livello del codone 39 (C → T) con una frequenza del 95,7%. L'effetto clinico sarà una Talassemia  $\beta^0$ .

Classificazione:

- $\beta$ -Talassemia
  - $\delta\beta$ -Talassemia
  - $\epsilon\gamma\delta\beta$ -Talassemia
- } Tutte basate su di un difetto di sintesi
- $\beta^0$ : mancata produzione di catene  $\beta$
  - $\beta^+$ : riduzione grave di produzione di catene  $\beta$
  - $\beta^{++}$ : riduzione lieve di produzione di catene  $\beta$

Gli esami che devono effettuare le coppie di talassemici:

1. Tipizzazione molecolare dei genitori.
2. Prelievo di cellule amniotiche, porle in coltura ed estrarre il DNA.

## MUTAZIONE

Per mutazione si intende un qualunque fenomeno, spontaneo o indotto, in grado di alterare la sequenza del DNA e che non venga riconosciuto ed eliminato dai sistemi cellulari di riparo del danno. Le mutazioni possono essere classificate in base alla loro dimensione (numero di paia di basi alterate) ed alla loro tipologia.

**Mutazione Genica:** è una modificazione strutturale all'interno della molecola del DNA a carico del gene, struttura unitaria minima che codifica generalmente per una sola informazione e che può determinare o un prodotto o un livello di regolazione del DNA.

Si suddividono poi in mutazioni puntiformi (sostituzione di uno o più coppie di nucleotidi (transizione o transversione) con conseguente variazione della sequenza generale) oppure prevedono inserzioni e delezioni intrageniche ovvero inserimenti o perdite di piccoli frammenti nucleotidici all'interno di sequenze geniche regolatorie o codificanti.

Infine a seconda del loro effetto possono essere classificate come

- **mutazioni silenti** (variazione della sequenza nucleotidica senza alterazione della sequenza aminoacidica codificata).

- **mutazione missenso** (variazione della sequenza nucleotidica con alterazione della sequenza aminoacidica primaria).

- **mutazione non senso** (variazione della sequenza nucleotidica che porta all'inserimento di un segnale di STOP che blocca la prosecuzione della sintesi della sequenza aminoacidica).

**Mutazione cromosomica:** è una modificazione delle macrostrutture codificanti (cromosomi), si può manifestare come riarrangiamento o perdita di interi pezzi di cromosoma; anche in questo caso esistono delle sottoclassificazioni:

- **Delezioni** (perdita di segmenti di cromosoma)

- **Inversioni** (corredo genetico invariato ma invertito di direzione)

- **Inserzioni e duplicazioni** (acquisizione di materiale genetico e copiatura di materiale genetico preesistente in coda alla copia originale)

- **Traslocazioni** (frammenti cromosomici che scambiano le loro posizioni)

mutazione genomica: è una variazione del numero di cromosomi dovuta a perdita o aggiunta di interi cromosomi.

- **Monosomie** (perdita di uno dei due cromosomi omologhi).

- **Trisomie o polisomie** (acquisizione di uno o pochi cromosomi in soprannumero).

- **Poliploidie** (ripetizioni di un numero intero di genomi, visto in genetica agraria).

## **MICROARRAY**

Valutiamo la funzione. Se quel gene o quel set di geni è espresso o se la sua espressione è cambiata.

### **SOUTHERN-BLOT**

Ci fa studiare la struttura del gene. Pesca con una sonda radioattiva complementare al gene che ci interessa. Se c'è una mutazione puntiforme non varierà la complementarità per cui non serve, ma è importante. Se ci sono polimorfismi di restrizione.

### **NORTHERN BLOT**

Valuta la presenza di RNA, nei campioni la quantità di RNA deve essere notevole. Un'altra metodica per valutare l'RNA è la RT-PCR (reverse-transcription PCR).

### **PCR Real Time**

Serve a vedere in tempo reale la reazione di PCR, ma ci permette anche di quantificare l'RNA presente.

## **MICROARRAY**

Misurano il livello di espressione degli mRNA trascritti dal gene nel sistema biologico.

Usi e Applicazioni:

- Predizione di efficacia e tossicità di un farmaco. Le cellule in coltura si trattano con dei farmaci poi si vanno a vedere i geni la cui espressione è comparata alla risposta della cellula non trattata. Vedremo quindi su quali geni i farmaci agiscono.
- Biologia dello sviluppo: nelle varie fasi di maturazione dei tessuti occorre vedere quali geni si esprimono e quelli che si spengono.
- Diagnosi molecolare di malattia: per capire il perché della mancata espressione di un gene e della ridotta sintesi della proteina corrispondente.

Gli RNA estratti dalle cellule di interesse devono essere marcati con molecole fluorescenti: quando sono colpiti da una radiazione di una certa lunghezza d'onda emettono un'altra radiazione che viene poi convogliata in un apparecchio che deve rilevarla.

Fluorocromo: Cy 3 emette una lunghezza d'onda di 550-570 nm.

Se il microarray è così c'è la piastra con tanti pozzetti su cui sono fissati oligonucleotidi e cDNA che sono rappresentativi dell'intero genoma. Teoricamente in ciascuno di questi pozzetti ci sono oligonucleotidi o cDNA complementari ai nostri geni. Poi estraggo l'RNA (deve essere convertito in cDNA) dal tessuto che mi interessa. Ci interessa solo l'mRNA che ha la coda di poli-A, se faccio un oligonucleotide di T questa va a ibridare la coda di poli-A, quindi prendo tutti gli mRNA del genoma, vengono trasformati in cDNA dalla trascrittasi inversa e poi li pongo nei pozzetti.

Gli mRNA sono marcati con fluorocromi. In genere si usano due fluorocromi per marcare i due tessuti diversi: quello basale e quello che ho trattato in qualche modo o affetto da patologia.

C'è uno scanner che legge la piastra e trascrive su carta il risultato.

L'intensità della fluorescenza emessa dalla molecola ibridizzata alla sonda riflette l'abbondanza di molecole di mRNA del sistema biologico in analisi.

Vi sono diversi fattori non biologici che influenzano l'intensità su un microarray, come ad es. il background.

I livelli di esposizione genica sono spesso di natura stocastica e quindi possono variare anche in condizioni molto simili.

Per rilevare in maniera accurata quali geni sono espressi a livelli diversi sono necessarie misure multiple nelle stesse condizioni.

Esistono diversi metodi matematici per determinare se un gene è espresso in modo diverso in diverse condizioni.

La più semplice è calcolare la media dei valori risultanti da diversi esperimenti ripetuti e poi calcolare il rapporto tra essi e ottenere il “field change”.

#### VALUTAZIONE RISULTATI OTTENUTI TRAMITE MICROARRAY

I risultati significativi ottenuti col microarray vanno convalidati tramite altre tecniche.

La più usata è la Reverse Trascrizione-Real Time PCR.

Poiché le due tecniche hanno diversa sensibilità i valori di field change ottenuti possono essere diversi, ma affinché il dato sia confermato il trend ottenuto tramite microarray e Real Time PCR deve essere lo stesso

## TEST DI SCREENING DI MUTAZIONI NOTE

Scelta del materiale per il test:

- DNA
- RNA
- Proteine

Due domande possibili:

1. I test genetici devono essere mirati? (targeted)
2. Il paziente ha altre mutazioni in questo particolare gene che possono provocare malattia?

## MALATTIE GENETICHE

### MUTAZIONE DI UN SINGOLO GENE

- Disordini autosomici dominanti
  - es. Malattia di Huntington (CAG)<sub>n</sub>
- Disordini autosomici recessivi
  - es.  $\beta$ -Talassemia
- Sex-lineage inheritance disorders
  - X-linked dominante
    - X Fragile
  - X-linked recessivo
    - DMD

## BASI MOLECOLARI DELLE MALATTIE EREDITARIE

### SINGOLE MUTAZIONI PUNTIFORMI

- Malattia di Huntington
  - (CAG)<sub>n</sub>
- Distrofia miotonica
  - (CTG)<sub>n</sub> o (CCTG)<sub>n</sub>
- Cromosoma X fragile
  - (CGG)<sub>n</sub>
- Fibrosi cistica
  - Cambiamento di un singolo nucleotide di CFTR

- Distrofia muscolare di Duchenne
  - 65% delezioni, 30% mutazioni non-senso
- Anemia drepanocitica (sickle cell anemia)
  - Sostituzione del VI amminoacido della  $\beta$ -catena E V →
- $\beta$ -Talassemia
  - diminuzione ( $\beta^+$  o  $\beta^{++}$ ) o assenza ( $\beta^0$ ) delle  $\beta$ -globine

## TEST GENETICI

Analisi a scopo clinico di DNA, RNA, cromosomi, proteine, metaboliti e altri prodotti genici fatta per evidenziare genotipi, mutazioni, fenotipi o cariotipi correlati o meno con patologie ereditabili umane. Questa definizione include gli screening prenatali, neonatali e dei portatori, nonché i test sulle famiglie a rischio. I risultati di queste indagini si possono applicare alla diagnosi e alla prognosi di malattie ereditarie, alla predizione del rischio-malattia, all'identificazione dei portatori sani, alle correlazioni genotipo-fenotipo. Vengono invece esclusi da questa definizione i test effettuati al solo scopo di ricerca.

## TEST DIAGNOSTICI

- Consentono di stabilire una diagnosi o confermare un sospetto clinico in un individuo già affetto.
- Possono essere effettuati durante il periodo prenatale o durante tutto l'arco di vita post-natale. Esempi sono: l'analisi citogenetica per individuare anomalie cromosomiche, la ricerca di mutazioni del gene CFTR in neonati con infezioni polmonari ricorrenti e sospetta fibrosi cistica, l'identificazione di espansioni del gene FRAXA in pazienti con un quadro clinico di ritardo mentale.

## TEST PRECLINICI O PRESINTOMATICI

- Numerose malattie genetiche, soprattutto quelle di tipo autosomico dominante, possono non essere presenti alla nascita ma comparire successivamente (ad es. Corea di Huntington).
- Se il gene responsabile è noto diventa possibile stabilire se un soggetto asintomatico abbia o meno ereditato l'allele mutato e, quindi, possa sviluppare in futuro la malattia ad esso associata.
- Il risultato del test genetico può consentire di ridurre la mortalità della malattia, qualora siano disponibili forme di prevenzione secondaria e adeguate terapie. Spesso, però, la disponibilità di un test genetico non si accompagna ad una migliore capacità di gestione clinica della malattia, anche se l'individuazione di soggetti a rischio può essere importante per applicare idonee strategie di prevenzione.

## TEST PER LA VALUTAZIONE DELLA SUSCETTIBILITÀ GENETICA

### (O PREDITTIVI)

- Alcuni test consentono l'individuazione di genotipi che non sono direttamente causa di malattia, pur comportando un aumentato rischio di sviluppare una patologia, se associati a esposizione a fattori ambientali che la favoriscono. Sono esempi di queste condizioni il deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi, che predispone a crisi di emolisi acuta in seguito all'assunzione di alcuni farmaci, o quello di alfa-1-antitripsina che, associato al fumo, predispone all'enfisema polmonare giovanile. Altri esempi: (ad es. ApoE4 e malattia di Alzheimer, polimorfismi del recettore delle chemochine e AIDS).

## TEST PER L'IDENTIFICAZIONE DEGLI ETEROZIGOTI

- Nel caso di malattie autosomiche recessive, come ad esempio la talassemia, è possibile identificare i portatori eterozigoti nella popolazione. Queste indagini, quando effettuate in maniera corretta e,

soprattutto, quando associate ad una larga diffusione dell'informazione, hanno avuto il risultato di ridurre l'incidenza della patologia in esame.

## INDAGINI MEDICO-LEGALI

- La presenza nel genoma umano di un numero straordinariamente elevato di regioni polimorfe, cioè individualmente variabili, e di marcatori utili a riconoscere queste regioni utilizzando tecniche relativamente semplici, consente sia l'accertamento di paternità che l'attribuzione di tracce biologiche a determinati individui con un grado di probabilità molto elevato.

### TRE DIFFERENTI PROBLEMI PER CHI ESEGUE IL TEST:

1. La malattia e' causata da una sola mutazione o da un piccolo numero di mutazioni ben caratterizzate (mutation screening);
2. Il gene e' clonato, ma vi sono molte possibili mutazioni. Occorrono test capaci di identificare differenze tra geni normali e mutanti (mutation scanning);
3. La mutazione non puo' essere caratterizzata, ma si puo' seguire il cromosoma che reca la mutazione attraverso una famiglia (gene tracking).

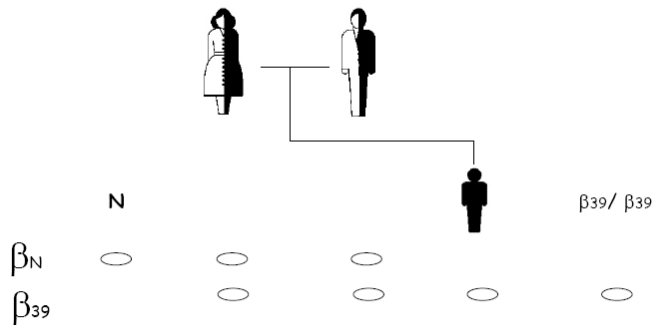
### METODI PER VERIFICARE LA PRESENZA DI UNA MUTAZIONE SPECIFICA

METODI	CONSIDERAZIONI
Digestione con enzimi di restrizione di DNA amplificato per PCR; controllo delle dimensioni dei prodotti su gel	Solo quando la mutazione crea o abolisce un sito di restrizione naturale o uno creato artificialmente con l'uso di specifici primer per la PCR
Ibridazione di DNA amplificato mediante PCR con oligonucleotidi allele-specifici (ASO) su dot-blot o un gene chip.	Metodo generale per le mutazioni puntiformi, grandi arrays consentono di ricercare ogni tipo di mutazione.
PCR utilizzando primers allele-specifici (ARMS test).	Metodo generale per le mutazioni puntiformi; è cruciale la struttura dei primers. Possono essere adatte per i chip, utilizzando la tecnologia TaqMan
Saggio di ligazione degli oligonucleotidi (OLA)	Metodo generale per le mutazioni puntiformi.
PCR con primers localizzati su entrambi i lati di un punto di rottura di una traslocazione.	Quando la PCR riesce, mostra la presenza del riarrangiamento.
Controllo delle dimensioni delle ripetizioni nucleotidiche espanse.	Metodo per le malattie da ripetizioni trinucleotidiche; le grosse espansioni richiedono il Southern Blot, quelle piu' piccole possono essere viste con la PCR.

### ALLELE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PROBES

- Usati per ibridazione in epoca pre-PCR come sonde radioattive su DNA clonato o genomico immobilizzato su membrana (Dot-blot, Southern).
- Diventati di largo uso come sonde su DNA amplificato.
- 15-17mers 30-50% G+C.
- C-A mismatch è più facile da discriminare di G-T.
- Problema polimorfismi.

### ASO per la $\beta^{39}$

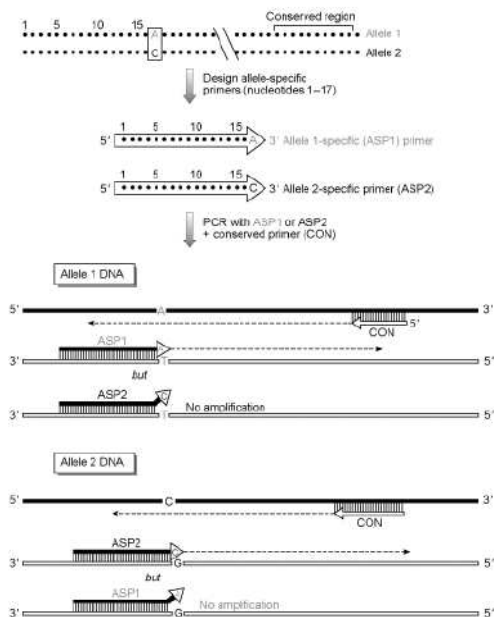


Test per la mutazione  $\beta^{39}$  [mutazione CAG -> TAG del codone 39 del gene per la  $\beta$  globina, causa molecolare di una comune forma di  $\beta$ -talassemia (beta zero-39)] basato sul dot-blot. Ibridazione con oligonucleotide normale (N) e mutante ( $\beta^{39}$ )

### VANTAGGI E LIMITI DELLA PCR-ASO

- Adatto all'analisi di molti casi e mutazioni.
- Solo mutazioni note.
- Realizzazione semplice, ma sviluppo laborioso (non disponibile per mutazioni rare).

### PCR allele-specifica (ARMS test)



PCR utilizzando primers allele-specifici (ARMS-test). È diverso dal MARMS, dove la M sta per Multiplex, dove vado ad analizzare diversi frammenti perché metto più primers.

Nell'ARMS-test:

1. I primers si ibridano.
2. La polimerasi comincia in direzione 5'-3'.
3. Se conosco la mutazione mi costruisco dei primers con l'ultima base 3' complementare alla mutazione.

Quindi devo sapere quale base muta e come così avrò due primers oligonucleotidi uno con il 3' finale complementare al wild type(?)



Si appaia solo se non c'è mutazione, infatti la polimerasi inizia solo se l'ultimo nucleotide del primer al 3' è appaiato. In caso contrario l'amplificazione non parte.

Questa tecnica la uso per le malattie dovute ad una sola mutazione puntiforme ma che può essere localizzata in più punti sullo stesso gene.

## VANTAGGI E LIMITI DELLA PCR-ARMS (Amplification-Refractory-Mutation-System)

- Adatto a un limitato numero di casi e mutazioni.
- Solo mutazioni note.
- Semplice da realizzare.
- Può essere usato per analisi aplotipi.
- Può essere automatizzato con l'uso di primers fluorescenti.

APLOTIPO: usato per indicare che in una certa zona di un gene ci sono dei polimorfismi.

L'RNA mitocondriale presenta delle zone di controllo che non codificano. Esse sono importanti per identificare l'appartenenza etnica e la maternità perché qui sono presenti zone ipervariabili dove si accumulano polimorfismi.

L'associazione dei polimorfismi definisce un aplotipo.

## FIBROSI CISTICA

Mutazioni puntiformi. La ricerca di mutazioni del gene CFTR. La più frequente è la delezione  $\Delta F508$ .

- The defect in a single gene results in the production of abnormally viscous mucus secretions causing recurrent chest infections, pancreatic insufficiency, malabsorption of food and intestinal obstruction in the newborn (meconium ileus).
- Almost all are single nucleotide mutation in CFTR gene.

## RICERCA DELLE MUTAZIONE NEL GENE CFTR

Le mutazioni CF sono più di 500, le più comuni hanno frequenza diversa nelle popolazioni:  $\Delta F508$  va dal 50% nel mediterraneo all'85% in Danimarca e nei paesi baschi, in media il 70% degli alleli mutati sono

$\Delta F508$ . Altre 12 mutazioni hanno una frequenza combinata del 15%. quindi le frequenze medie dei genotipi dei malati di fibrosi cistica sono :

49%  $\Delta F508/\Delta F508$

21%  $\Delta F508$ /mutaz. comune non  $\Delta F508$

21%  $\Delta F508$ /mutaz.rara

4.5% mutaz. comune non  $\Delta F508$ /mutaz. rara

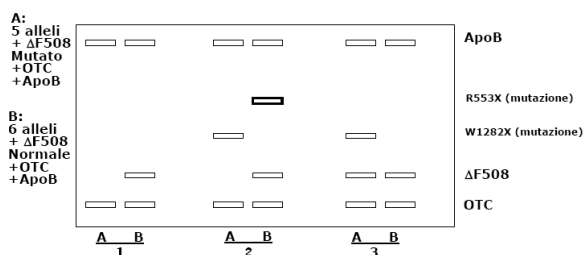
2.25% mutaz. comune non  $\Delta F508$ / mutaz. comune non  $\Delta F508$

2.25% mutaz. rara/mutaz. Rara

Circa il 90% degli affetti ha almeno un allele  $\Delta F508$  e sar  comunque possibile in Europa identificare circa il 70% dei genotipi utilizzando i test per le mutazioni comuni.

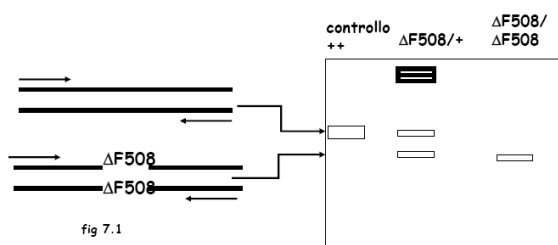
## ARMS PER LA RICERCA DELLE MUTAZIONI IN CF

PCR con primer multipli in ogni provetta e controlli per geni non correlati a CF, l'amplificato viene caricato su gel di agarosio il DNA proviene da affetti.

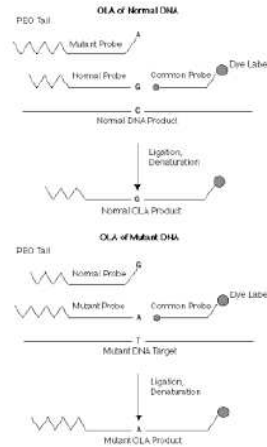
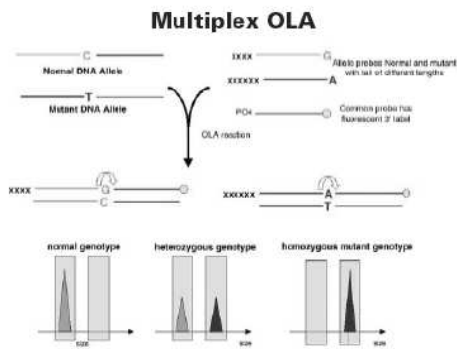


## RICERCA DELLA $\Delta F508$

PCR di una regione di 100pb che comprende la sequenza deleta e corsa su gel di poliacrilammide.



OLA (Oligonucleotide Ligation Assay: Saggio di Ligazione degli Oligonucleotidi)

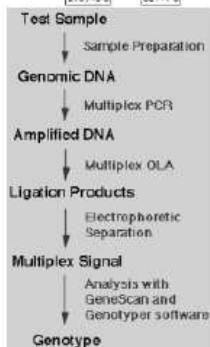
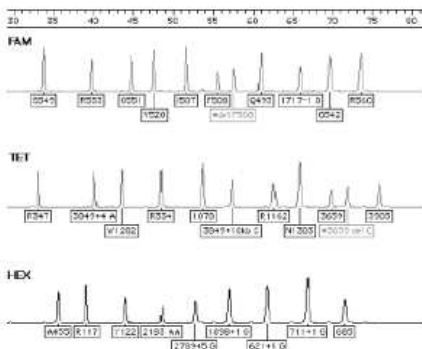


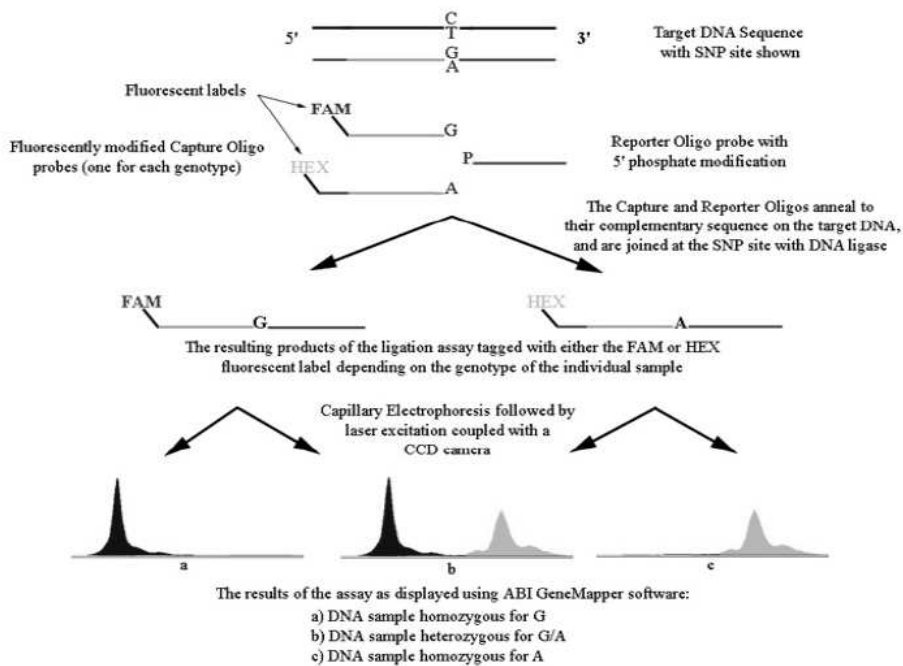
Questo test consente lo screening per 31 mutazioni note per la fibrosi cistica in una singola reazione ed una singola corsa elettroforetica. In questo test e' usato un cocktail di 15 coppie di primers per amplificare regioni del gene CFTR dove sono localizzate mutazioni comuni. Ogni segmento amplificato (o amplicone) e' poi testato per OLA con tre oligonucleotidi

(oligo comune marcato in maniera fluorescente+oligo normale+oligo mutante).

## TEST OLA

Ad ogni locus, se la mutazione non e' presente, solo l'oligo comune e quello normale daranno un prodotto di ligazione; se e' presente solo la mutazione, solo l'oligo comune e mutante daranno prodotto di ligazione; in campioni eterozigoti sia l'oligo normale che il mutante si legheranno all'oligo comune in uguale quantita' ma dando prodotti di differente mobilita'. Dopo la ligazione, il prodotto di ogni amplicone ha un'unica combinazione di mobilita' elettroforetica e di fluorescenza che permette l'identificazione del genotipo dalla separazione dei picchi dei prodotti di ligazione in ciascuno dei tre colori (il kit per la fibrosi cistica e' disegnato in modo da avere 10-12 picchi blu, 10-12 verdi e 9-11 gialli). Un controllo interno rosso permette di dimensionare precisamente i prodotti.





## OLIGONUCLEOTIDE LIGATION ASSAY (OLA): USING OLA TO TEST 31 HOT SPOTS IN CFTR

### RICERCA DELLE MUTAZIONE NEL GENE DMD

Due terzi dei casi di Distrofia Muscolare di Duchenne sono dovuti a delezioni che coinvolgono uno o più esoni. Ci sono due "hot spot" di mutazioni: 5' esoni dal 3 all'8 e al 3' esoni dal 44 al 60 (principalmente 44-50). Anche in questo caso si usa una PCR multiplex con reazioni prodotte da più coppie di primer, ognuna delle quali amplifica uno specifico esone. Se c'è la delezione non c'è amplificazione (naturalmente si sa quale è l'aspetto di una corsa elettroforetica di un maschio normale). L'interpretazione nel caso delle femmine eterozigoti può essere ambigua perchè la X normale viene amplificata.

[Parte presente negli appunti]

PCR con primers localizzati ad entrambi i lati di un punto di rottura di una traslocazione.

Controllo delle dimensioni delle ripetizioni nucleotidiche espanse.

Per identificare le delezioni posso utilizzare una PCR o un Southern Blot.

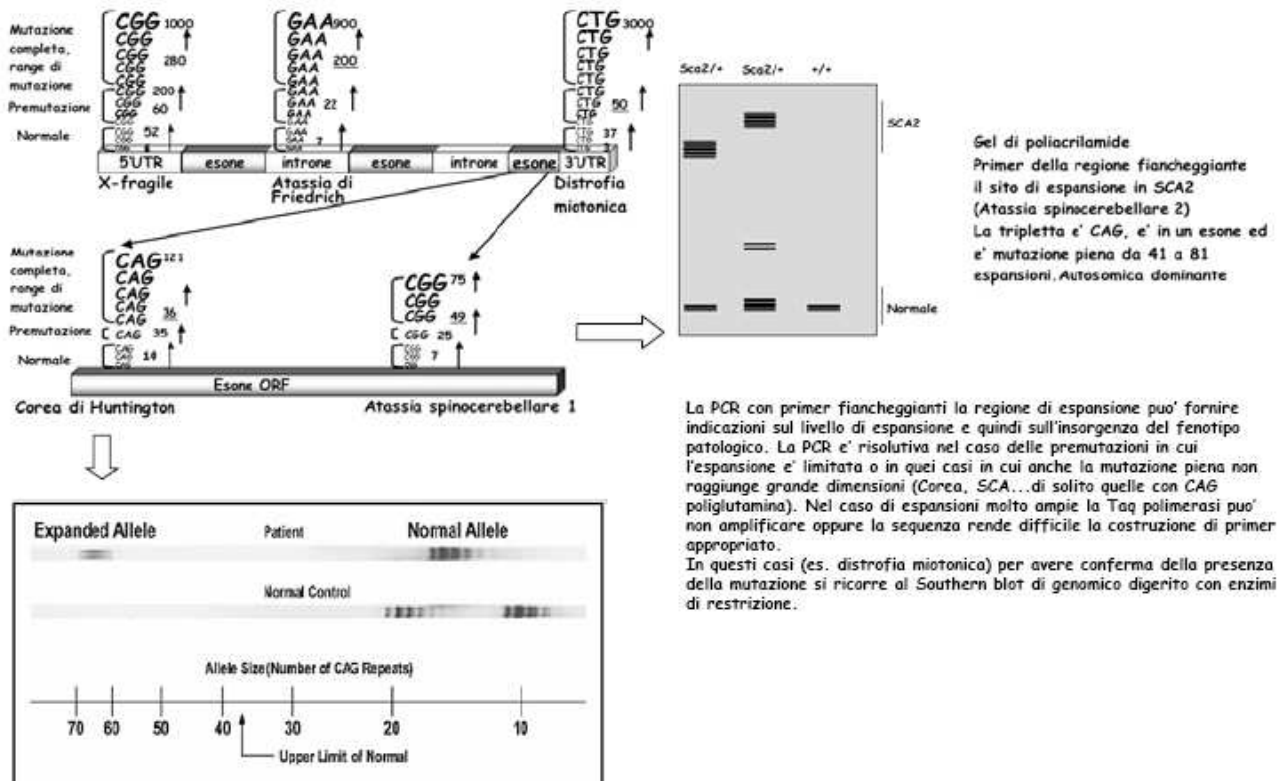
Per determinare una mutazione puntiforme esiste comunque il sequenziamento del DNA.

### MULTIPLEX

Per le delezioni della Distrofia muscolare di Duchenne.

### SINDROMI DA ESPANSIONE DI TRIPLETTE

Io so dove è localizzata la tripletta espansa, il laboratorio mi deve dire quanto è lungo il frammento che contiene le ripetizioni.



## DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE MALATTIE DA ESPANSIONE DO TRIPLETTE

- Huntington disease (CAG)<sub>n</sub>
  - polyglutamine repeat
  - A fragment is amplified by PCR, PAGE, silver stain
  - lane 1,2,6,10 are normal, others are affected people
- Myotonic dystrophy (large expansion)
  - Southern blot, bands of 9,10 kB are normal
- Fragile X (CGG)<sub>n</sub>
  - Southern blot, DNA is digested with *Eco*XI + *Eco*RI
  - The DNA of the inactivated female is methylated *Eco*XI is sensitive to methylation (do not cut)
  - Hybridize to Ox1.9 probe

## HUNTINGTON'S DISEASE

- La proteina sintetizzata dal gene dell'Huntington si chiama **huntingtina**.
- La **Huntingtina** indirettamente porta a danni delle cellule nervose e la tossicità è attraverso la formazione di aggregati di proteine neuronali e inclusioni.

## DETECTION OF TRINUCLEOTIDE REPEAT DISEASES I (HUNTINGTON DISEASE)

## DETECTION OF TRINUCLEOTIDE REPEAT DISEASES II (MYOTONIC DYSTROPHY)

## MULTIPLEX SCREEN FOR DYSTROPHIN DELETIONS IN MALES

## CROMOSOMA X FRAGILE

- Caratterizzata da regioni satellite visibili alle estremità dei cromosomi in metafase. Queste sono dovute a una lunga serie di triplette CGG ripetute (a causa dello spostamento all'indietro di sezione figlia).
- Orecchie prominenti e allungate e viso allungato.
- La maggior parte dei maschi affetti hanno un ritardo mentale, e i loro testicoli sono più grandi del normale.

## DIAGNOSI DI X-FRAGILE IN LABORATORIO

- Citogenetica: il sito fragile si evidenzia solo se le cellule vengono fatte crescere in assenza di folati o di timidina. Nelle eterozigoti bisogna analizzare un gran numero di cellule.
- Molecolare: con la PCR si amplificano le ripetizioni normali e pre-mutanti, con il Southern blotting quelle di dimensioni maggiori.

## MUTATION DETECTION BY SEQUENCING