



SOCIETÀ ITALIANA
PER LE MALATTIE
RESPIRATORIE INFANTILI
SIMRI

Pneumologia Pediatrica

Volume 10, n. 39

Rivista trimestrale
Spedizione in A.P. - 45%
art. 2 comma 20/b
legge 662/96 Pisa
Reg. Trib. PI n. 12
del 3 giugno 2002

Novità dal Congresso SIMRI 2010

Organo ufficiale
della Società Italiana per le
Malattie Respiratorie
Infantili (SIMRI)

*Official Journal
of the Italian Pediatric
Respiratory Society*

www.simri.it

XIV VENEZIA 3/5
GIUGNO 2010
CONGRESSO
NAZIONALE
DELLA
SIMRI

Le novità che il pediatra <

deve conoscere

I giovani ricercatori <

I casi clinici <

Massimo Pifferi, Maria Di Cicco, Bruno Fiori, Martina Piras, Gloria Bettini, Pierantonio Macchia

Sezione Pneumologia e Allergologia, U.O. Pediatria I, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana

Novità in tema di discinesia ciliare primaria

Advances on primary ciliary dyskinesia

Parole chiave: discinesia ciliare primaria, agenesia dei seni paranasali, ossido nitrico nasale, ossido nitrico sintetasi, polimorfismi genetici, ciliogenesi in coltura, funzione polmonare, terapia genica

Keywords: *primary ciliary dyskinesia, agenesis of paranasal sinuses, nasal nitric oxide, nitric oxide synthase, gene polymorphism, ciliogenesis in culture, lung function, gene therapy*

Riassunto. Numerosi sono ancora i problemi aperti che ritardano o rendono difficile l'inquadramento diagnostico della discinesia ciliare primaria e poco si conosce sulle reali necessità dei soggetti affetti in termini di monitoraggio e di appropriatezza delle cure. Vengono, pertanto, riferiti i risultati delle ricerche più recenti riguardanti rispettivamente gli elementi che possono farne sospettare la diagnosi (in particolare la presenza di una mancata o ridotta pneumatizzazione dei seni paranasali), il significato della misurazione dell'ossido nitrico nasale (utilizzata come test di screening), i progressi nelle tecniche diagnostiche (in particolare la possibilità di eseguire colture dell'epitelio respiratorio ciliato anche utilizzando campioni prelevati mediante brushing nasale), le nuove conoscenze sull'evoluzione della funzione respiratoria, sulle necessità del suo monitoraggio ed infine le prospettive di sviluppo di terapie geniche mirate al ripristino della funzione ciliare.

Accettato per la pubblicazione il 25 agosto 2010.

Corrispondenza: Massimo Pifferi, Sezione di Pneumologia e Allergologia, U.O. Pediatria I, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Via Roma 67, 56126 Pisa; e-mail: m.pifferi@med.unipi.it

Introduzione

Le alterazioni del movimento delle ciglia dell'epitelio respiratorio sono state riconosciute come causa di malattia cronica in seguito alla descrizione di anomalie dell'ultrastruttura delle ciglia da parte di Afzelius nella sindrome di Kartagener. Questa sindrome, caratterizzata dalla presenza di sinusite cronica, bronchiectasie e *situs inversus totalis*, viene quindi considerata far parte della Discinesia Ciliare Primaria (DCP). La letteratura scientifica è concorde nel sostenere che la diagnosi di DCP deve avvalersi della microscopia elettronica e dello studio della funzione ciliare, mentre alla misurazione dell'Ossido Nitrico Nasale (nNO), che non fornisce informazioni dirette sulle ciglia respiratorie, viene affidato solo il ruolo di test di screening [1]. Infatti, da tempo sappiamo che la DCP è generalmente caratterizzata, pur non conoscendosene la ragione, dalla presenza di bassi livelli di questo gas; tale reperto è comune ad altre condizioni patologiche, quali la

sinusite e la fibrosi cistica, e ciò rende conto del riscontro di risultati falsamente positivi quando si utilizza la misurazione dell'nNO come test di screening [1, 2]. D'altra parte, ancora meno è noto perché talvolta vengano misurati valori elevati del gas in soggetti sicuramente affetti dalla DCP.

Purtroppo, come spesso accade in medicina e particolarmente nelle malattie rare o conosciute da poco tempo, numerosi sono ancora i problemi aperti che ritardano o rendono difficile l'inquadramento diagnostico della DCP. Inoltre, poco si conosce ancora sulle reali necessità dei soggetti affetti in termini di monitoraggio e di appropriatezza delle cure.

Novità sugli elementi che possono far sospettare la diagnosi di DCP

Il sospetto diagnostico si deve basare su elementi clinici certi, ma di alcune caratteristiche peculiari

della DCP esistevano fino a poco tempo fa solo sporadiche segnalazioni, non essendone mai stata valutata la presenza su una coorte sufficientemente ampia di pazienti. È il caso dell'agenesia o dell'ipoplasia dei seni paranasali, situazioni che potrebbero contribuire a quei bassi livelli di nNO di cui non si conosce la ragione. A tale scopo, recentemente, abbiamo condotto uno studio [2] in una serie di pazienti, appartenenti sia all'età pediatrica (in età compresa tra 8 e 17 anni), sia a quella adulta, di cui poco meno della metà affetti da DCP ed i rimanenti da Discinesia Ciliare Secondaria (DCS) a processi infiammatori; e abbiamo dimostrato, mediante valutazione TC, che agenesia ed ipoplasia dei seni frontali (Figura 1) e/o sfenoidali, in rapporto al loro abituale sviluppo post-natale, erano significativamente più frequenti nel primo gruppo (73% dei pazienti con DCP) rispetto al secondo (38% dei soggetti con DCS).

Nei pazienti con DCP si dimostrava, inoltre, una significativa associazione tra la presenza di uno sviluppo completo dei seni paranasali e livelli elevati di nNO. Tuttavia, il fatto che soltanto i seni che sviluppano in epoca post-natale siano interessati dalla mancata o ridotta pneumatizzazione e che non si dimostri alcuna correlazione tra la presenza di aplasia o di ipoplasia ed età dei pazienti suggerisce che cause esogene possano contribuire alla loro patogenesi, agendo magari sul *background* della malattia genetica. Comunque, poiché aplasia od ipoplasia dei

seni frontali e/o sfenoidali possono far parte dello spettro delle manifestazioni proprie della DCP, la loro dimostrazione dovrebbe indurre ad escludere tale condizione mediante test specifici [2].

Novità sul significato della misurazione del nNO

Fino ad oggi solo pochi studi sono stati condotti per chiarire l'origine dei livelli generalmente bassi di nNO nei pazienti con DCP, la cui conoscenza potrebbe renderci più consapevoli nell'interpretazione di tali misurazioni e delle loro potenziali implicazioni nella valutazione del coinvolgimento respiratorio. Pertanto, la significativa correlazione, che abbiamo dimostrato [3], tra crescenti livelli di nNO ed incrementi nella frequenza del battito delle ciglia dell'epitelio respiratorio e tra livelli progressivamente più bassi di nNO e percentuali più elevate di ciglia immobili nei soggetti con DCP o DCS, per certi versi intuibile, ha rappresentato la base per ulteriori ricerche.

Come è noto, l'ossido nitrico è un prodotto del metabolismo della L-arginina per l'azione di una delle tre isoforme dell'Ossido Nitrico Sintetasi (NOS): neuronale (NOS 1), inducibile (NOS 2) ed endoteliale (NOS 3), e si è ritenuto che nella DCP sia presente un disaccoppiamento del processo contrattile delle ciglia dal NOS che conduce ad un difetto di produzione di ossido nitrico o che i bassi



Figura 1 Agenesia dei seni frontali in una ricostruzione volumetrica tridimensionale (A); Agenesia del seno frontale destro ed ipoplasia del sinistro in una sezione assiale (B).

livelli di nNO siano espressione di un disordine generalizzato del metabolismo dell'ossido nitrico delle vie aeree con alterazioni di tutte e tre le isoforme del NOS. Per verificare questa seconda ipotesi abbiamo valutato [3] se l'espressione dell'acido ribonucleico messaggero (mRNA) del NOS 2 e del NOS 3 sia diversa nella mucosa nasale di bambini affetti da DCP e da DCS e se nei due gruppi i livelli di espressione siano correlati ai valori di nNO. Abbiamo in tal modo dimostrato che nei pazienti con DCP l'espressione mRNA del NOS 2 (ma non l'espressione mRNA del NOS 3) è significativamente più bassa rispetto ai soggetti con DCS e che sia nell'intera popolazione, sia nei soli pazienti con DCP è presente una correlazione positiva significativa tra l'espressione mRNA del NOS 2 e i livelli di nNO, facendo ritenere che NOS 2 sia la maggiore sorgente di nNO nella DCP (ove i livelli di nNO sono significativamente più bassi). Nessuna differenza tra i due gruppi risultava, invece, per l'espressione mRNA del NOS 3, escludendo così la possibilità che nella DCP sia presente un'alterazione generalizzata della regolazione dell'ossido nitrico.

Inoltre, poiché precedentemente è stato dimostrato nella fibrosi cistica che varianti nei geni che codificano per il NOS possono agire come modificatrici della malattia [4], siamo andati a valutare se il polimorfismo 894G/T nel gene NOS 3 è associato ad un particolare fenotipo clinico di DCP e, sebbene in generale questo non sembri influenzare i livelli nNO, ne abbiamo dimostrato [3] la presenza nel 70% dei soggetti con valori più elevati di nNO (oltre il *cut-off* abitualmente considerato di 250 ppb).

Infine, la presenza dell'allele T nei soggetti con DCP appariva inversamente correlata alle alterazioni ultrastrutturali più tipiche di tale condizione, quali l'assenza dei bracci interno ed esterno di dineina, e si associava ad una frequenza del battito ciliare più elevata rispetto ai pazienti con omozigosi per l'allele G [3]. In presenza della variante T si osservava anche una minore incidenza di colonizzazioni da *Pseudomonas aeruginosa*, insieme ad un apparente effetto protettivo dalle infezioni delle vie aeree nelle pazienti di sesso femminile dopo la pubertà [3].

Novità sulla diagnosi

La diagnosi della DCP richiede l'analisi delle cellule ciliate dell'epitelio respiratorio e si basa sulla valutazione della funzione e dell'ultrastruttura ciliare [1, 5].

Tuttavia, anche con queste indagini la diagnosi di DCP può non essere facile. Infatti, oltre alle difficoltà od incertezze diagnostiche legate ad alterazioni secondarie alla presenza di processi flogistico-infettivi nelle sedi di campionamento, si possono avere alterazioni primitive della funzione in pazienti con normale ultrastruttura ciliare [1, 5]. In un sottogruppo di pazienti con normale ultrastruttura, infine, anche il movimento è apparentemente normale e la compromissione del trasporto di muco è legata all'orientamento casuale delle ciglia [1, 5]. Pertanto, nei soggetti con evidenti alterazioni del movimento ciliare nei quali non siano dimostrabili anomalie ultrastrutturali significative è indicata la ripetizione dell'analisi dell'attività ciliare *in vitro* dopo un adeguato periodo di trattamento fisioterapico e farmacologico [1, 5]. Tale procedura riduce le possibilità di errori diagnostici anche se non li elimina del tutto [1].

In alternativa possono essere utilmente impiegate le colture di cellule epiteliali ciliate per lo studio della ciliogenesi in ambiente privo di *noxae* patogene che, mediante valutazione diretta del movimento delle cellule respiratorie ciliate aggregate in forma di sferoidi, permette di escludere la natura congenita delle alterazioni precedentemente evidenziate [6]. Le colture cellulari sono oggi possibili anche utilizzando campioni prelevati mediante *brushing* nasale e sono state superate le difficoltà del passato, legate essenzialmente alla necessità di porre in coltura campioni abbondanti di mucosa, ottenibili esclusivamente mediante biopsia e a prezzo di epistassi e dolore [6].

Anche le valutazioni genetiche possono risultare utili a confermare la diagnosi nei pazienti con alterazioni della funzione ma con normale ultrastruttura ciliare [5, 7]. Tuttavia, tali indagini non possono essere raccomandate come parte dei test diagnostici iniziali, ma devono essere eseguite solo nei casi in cui è verosimile evidenziare le mutazioni responsabili della DCP sulla base delle indicazioni fornite dall'esame ultrastrutturale e dall'analisi del movimento ciliare [5, 7].

Novità sul monitoraggio

Sebbene da tempo si fosse consapevoli dell'importanza di un monitoraggio regolare della funzione respiratoria nei pazienti con DCP, si è a lungo ritenuto che il danno polmonare fosse progressivo e significativo fino al momento della diagnosi, con

un'ostruzione delle vie aeree parzialmente reversibile, non evidenziandosi un ulteriore declino della funzione respiratoria durante il *follow-up* [8, 9]. Infatti, solo recentemente è stato evidenziato che la funzione polmonare può essere severamente minacciata già in età prescolare e che il suo andamento è molto variabile ed indipendente dall'età o dal livello funzionale al momento della diagnosi, per cui anche se questa è posta precocemente può non evitare il declino della funzione respiratoria [10].

Un progressivo peggioramento delle condizioni respiratorie, un progressivo abbandono della fisioterapia respiratoria, una progressiva perdita d'interesse per il trattamento, insieme ad un progressivo e continuo impatto sulla salute fisica e mentale nei soggetti con DCP sono stati anche registrati in uno studio sulla qualità della vita correlata alle loro condizioni di salute [11] e ciò ha fatto emergere la necessità per tali pazienti di essere seguiti da un team multidisciplinare in centri specialistici con esperienza nella loro gestione e di una migliore integrazione tra questi centri ed il territorio (ospedali distrettuali e medici di famiglia). In tal modo, potrà essere reso più facile l'accesso dei pazienti a valutazioni più sofisticate che potranno rivelare l'interessamento respiratorio nelle fasi più precoci. Come è ritenuto avvenire nella fibrosi cistica [12], probabilmente, infatti, anche nella DCP si ha un esordio precoce della malattia respiratoria dalle piccole vie aeree e verosimilmente il loro rimodellamento, insieme all'ostruzione che ne consegue, è causa di air-trapping. Questa condizione può essere documentata attraverso la valutazione dei volumi statici polmonari, che, come emerge da uno studio che abbiamo condotto recentemente [13], appaiono significativamente correlati alla presenza e/o severità delle lesioni evidenziate dalla tomografia computerizzata ad alta risoluzione (HRCT) del torace.

Novità sul trattamento

La mancanza di *trial* controllati randomizzati riguardanti la terapia della DCP ha indotto a mutuare gran parte dei trattamenti utilizzati nella pratica clinica dalla fibrosi cistica, con la quale la DCP, malgrado le importanti differenze dal punto di vista fisiopatologico, condivide la presenza di un

deficit del trasporto muco-ciliare [14]. Ad oggi, pertanto, non esistono trattamenti che possano correggere la disfunzione ciliare e ci si avvale esclusivamente di trattamenti di supporto. Tuttavia, recentemente uno studio sperimentale [15] ha dimostrato che, utilizzando un lentivirus che funge da vettore (*Figura 2*), è possibile trasferire un gene normale (gene "terapeutico") a cellule di mucosa nasale umana, che, presentando mutazioni in eterozigosi composta di quello stesso gene, hanno ciglia prive dei bracci esterni di dineina all'esame ultrastrutturale ed immobili. Il gene trasferito, che viene trascritto ed espresso, si dimostra in grado di ripristinare in quelle cellule la normale ultrastruttura e il normale movimento ciliare. Questo studio è importante perché, dimostrando per la prima volta che è possibile inserire geni "terapeutici" entro il genoma cellulare, può aprire nuove prospettive per il trattamento della DCP mediante lo sviluppo di terapie geniche mirate da utilizzare in vivo.

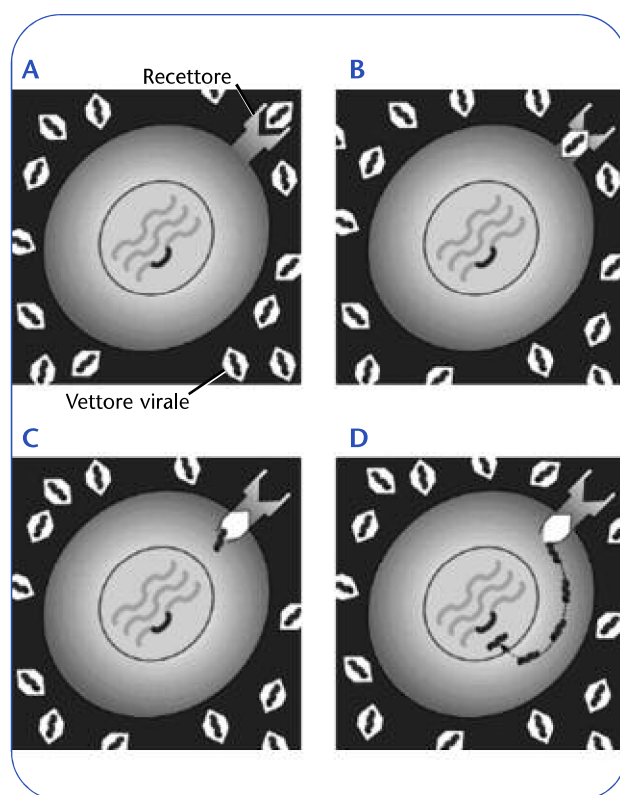


Figura 2 Fasi del trasferimento di un "gene terapeutico" mediante vettore virale.

Bibliografia

1. Bush A, Chodhari R, Collins N, et al. *Primary ciliary dyskinesia: current state of the art*. Arch Dis Child 2007; 92: 1136-1140.
2. Pifferi M, Bush A, Caramella D, et al. *Agenesis of paranasal sinuses and nasal nitric oxide in primary ciliary dyskinesia*. Eur Respir J; 2010 Jul 22 [E-pub ahead of print].
3. Pifferi M, Bush A, Maggi F, et al. *Nasal nitric oxide and nitric oxide synthase expression in primary ciliary dyskinesia*. Eur Respir J 2010 (submitted).
4. Grasemann H, Storm van's Gravesande K, Buscher R, et al. *Endothelial nitric oxide synthase variants in cystic fibrosis lung disease*. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167: 390-394.
5. Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, et al. *Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children*. Eur Respir J 2009; 34: 1264-1276.
6. Pifferi M, Montemurro F, Cangiotti AM, et al. *Simplified cell culture method for the diagnosis of atypical primary ciliary dyskinesia*. Thorax 2009; 64: 1077-1081.
7. Pifferi M, Michelucci A, Conidi ME, et al. *New DNAH11 mutations in primary ciliary dyskinesia with normal axonemal ultrastructure*. Eur Respir J 2010; 35: 1413-1416.
8. Ellerman A, Bisgaard H. *Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia*. Eur Respir J 1997; 10: 2376-2379.
9. Hellinckx J, Demedts M, De Boeck K. *Primary ciliary dyskinesia: evolution of pulmonary function*. Eur J Pediatr 1998; 157: 422-426.
10. Marthin JK, Petersen N, Skovgaard LT, Nielsen KG. *Lung function in patients with primary ciliary dyskinesia: a cross-sectional and 3-decade longitudinal study*. Am J Respir Crit Care Med 2010; 181: 1262-1268.
11. Pifferi M, Bush A, Di Cicco M, et al. *Health-related quality of life and unmet needs in patients with primary ciliary dyskinesia*. Eur Respir J 2010; 35: 787-794.
12. Tiddens HA, Donaldson SH, Rosenfeld M, Paré PD. *Cystic fibrosis lung disease starts in the small airways: can we treat it more effectively?* Pediatr Pulmonol 2010; 45: 107-117.
13. Di Cicco M, Zangani M, Macchia P, et al. *Valutazione della funzione respiratoria e rimodellamento delle vie aeree in pazienti con discinesia ciliare primaria*. Pneumologia Pediatrica 2010; 39: 31-33.
14. Amirav I, Cohen-Cymerknoh M, Shoseyov D, Kerem E. *Primary ciliary dyskinesia: prospects for new therapies, building on the experience in cystic fibrosis*. Paediatr Respir Rev 2009; 10: 58-62.
15. Chhin B, Negre D, Merrot O, et al. *Ciliary beating recovery in deficient human airway epithelial cells after lentivirus ex vivo gene therapy*. PLoS Genet 2009; 5: e1000422.