

Ogni Corso di Area Pediatrica, staccato e raccolto, formerà nel tempo un volumetto.

Attenzione: nel prossimo numero troverete l'ultima parte del corso di Biologia Molecolare.



BIOLOGIA MOLECOLARE

I corsi di

ACHILLE IOLASCON*^o, MARIA FELICIA FAIENZA*^o

*Dipartimento di Biomedicina dell'età evolutiva e Centro interuniversitario per lo studio delle malattie ereditarie (CISME), Università di Bari

^oIstituto di Clinica Pediatrica, Università di Foggia

Dire ai genitori che il proprio figlio è affetto da una malattia mitocondriale potrebbe provocare una risposta del genere: "mito cosa?". Infatti la maggior parte delle persone non conosce questo termine e non sa cosa significhi. La mancanza di conoscenza da parte della comunità può rappresentare un'enorme barriera in relazione all'istituzione di adeguati servizi per i bambini affetti.

Un ulteriore problema è la mancanza di conoscenza da parte di molti medici, in quanto la diagnosi di questo tipo di patologie non è facile. Se si chiede al genitore di un bambino affetto da malattia mitocondriale di raccontare la sua storia, dirà di aver compiuto un percorso molto lungo e difficile per arrivare alla diagnosi.

Ciò è dovuto al fatto che le malattie mitocondriali possono manifestarsi in maniera assai differente: due individui - anche della stessa famiglia, anche gemelli - con lo stesso difetto della catena respiratoria possono avere sintomi clinici completamente differenti e presentare un diverso quadro clinico.

La possibilità che ha un medico di famiglia, non specialista in disordini mitocondriali e metabolici, di trovarsi di fronte a pazienti con questa patologia è di una o al massimo due nel corso di tutta la sua carriera. Pertanto il rischio sarà quello di incorrere in affermazioni scorrette, ad esempio:

- ❖ il paziente affetto da un disordine mitocondriale deve avere un aspetto "orribile";
- ❖ tutti i bambini con malattia mitocondriale devono essere mentalmente ritardati;
- ❖ tutti i bambini che hanno una malattia mitocondriale devono avere alti livelli di acido lattico;
- ❖ tutti i bambini con malattia mitocondriale deteriorano lentamente e muoiono.

Struttura del corso

Basi teoriche

1 - Pediatria e genetica.

L'importanza del linguaggio. Glossario (Pubblicato su AP n. 2/2000)

2 - Organizzazione del genoma umano: struttura e funzione di DNA e RNA. Funzione e struttura dei geni (Pubblicato su AP n. 5/2000)

3 - Le basi cromosomiche dell'ereditarietà: dominanza, recessività, X-linked (Pubblicato su AP n. 7/2000)

4 - L'ereditarietà non mendeliana: isodisomia, imprinting, malattia delle triplette (Pubblicato su AP n. 2/2001)

5 - L'ereditarietà mitocondriale

6 - Le biotecnologie: che cosa offrono al pediatra. Un volo sulle tecniche e sulla loro applicazione nella pratica pediatrica

Scopo di questo articolo è quello di rendere più accessibile a coloro che non si interessano di questo campo, la diagnostica e l'inquadramento di questo tipo di patologia.

CHE COS'È

UNA MALATTIA MITOCONDRIALE

Le malattie mitocondriali, meglio indicate come disordini mitocondriali, colpiscono 1 individuo su 4.000 e comprendono sia malattie metaboliche caratterizzate da difetti di specifiche funzioni enzimatiche sia malattie con difetti di enzimi della catena respiratoria. Il termine "malattia mitocondriale" si riferisce essenzialmente alla patologia di una specifica funzione mitocondriale, la fosforilazione ossidativa, localizzata a livello della catena respiratoria dei mitocondri.





I mitocondri, organelli citoplasmatici presenti in numero di 100 o più in ogni cellula, producono adenosinatrifosfato (ATP), la sorgente di energia mobile del nostro organismo.

Il processo metabolico attraverso cui viene prodotto l'ATP è costituito da una serie ordinata di reazioni ossidoriduttive effettuate dai complessi respiratori I, II, III, IV e V. L'intero processo è noto come fosforilazione ossidativa e i cinque complessi respiratori, insieme agli scambiatori di elettroni, formano la cosiddetta "catena respiratoria mitocondriale". I mitocondri sono pertanto gli organelli chiave per la sopravvivenza cellulare.

Quando si verifica un danno mitocondriale, il supporto vitale di ATP è alterato, con riduzione della generazione energetica all'interno delle cellule. Le cellule che richiedono la maggior quantità di energia, come il cervello, il cuore e i muscoli scheletrici, sono quindi le più vulnerabili.

Dal punto di vista genetico, la fosforilazione ossidativa rappresenta un esempio unico, essendo il risultato della complementazione tra due distinti sistemi genetici, il genoma nucleare e quello mitocondriale. Geni contenuti nel DNA nucleare (nDNA) codificano per la maggior parte delle proteine mitocondriali, comprese le subunità proteiche dei complessi respiratori.

Alcune subunità sono però codificate da geni appartenenti a un genoma separato da quello nucleare e contenuto nei mitocondri stessi, il DNA mitocondriale (mtDNA).

Il mtDNA umano è una molecola costituita da una doppia elica circolare di 16.569 paia di basi, presente in copie multiple nei mitocondri.

Il mtDNA contiene solo 37 geni, di cui 13 codificano per polipeptidi della catena respiratoria. La caratteristica di questo DNA è di presentare un'alta velocità di mutazioni, assenza di istoni e di introni, pochi sistemi di riparo e una facilità di esposizione al danno da radicali ossidanti.

COME SI EREDITA UNA MALATTIA MITOCONDRIALE

A rendere più complessi i disordini mitocondriali è la modalità di ereditarietà genetica.

A differenza del DNA nucleare, per il quale abbiamo un corredo diploide nello zigote e nelle cellule somatiche, con una copia materna e una pa-

terna dell'informazione genetica (2 cromosomi omologhi), il mtDNA è presente in 2-10 copie per organello e pertanto in centinaia o migliaia di copie per cellula (poliplasmia). Se esiste una mutazione del mtDNA, questa può interessare tutte le cellule (omoplasmia) oppure può risultare nella coesistenza di due popolazioni di mtDNA, uno normale e uno mutato (eteroplasmia). Quindi il mtDNA è poliploide e viene ereditato esclusivamente dalla madre. Infatti i mitocondri degli spermatozoi sono localizzati nella coda, che non penetra la cellula uovo per la fecondazione. Ciò farebbe pensare che i disordini mitocondriali sono ereditati solo attraverso il mtDNA materno ma ciò non è vero.

Tre sono i tipi di ereditarietà delle malattie mitocondriali:

- ❖ **ereditarietà materna:** difetti nel DNA mitocondriale quali mutazioni puntiformi, delezioni e duplicazioni puntiformi; contributo soltanto materno;
- ❖ **ereditarietà autosomica:** difetti nel DNA nucleare dominanti o recessivi; contributo di entrambi i genitori;
- ❖ **ereditarietà X-linked:** difetti del cromosoma X.

LE MANIFESTAZIONI CLINICHE E LA DIAGNOSI

Dal punto di vista clinico, l'espressione fenotipica di una malattia mitocondriale è legata al cosiddetto "effetto soglia". Ciò significa che i sintomi, la gravità, l'età di esordio ecc. di una malattia mitocondriale possono variare in dipendenza della percentuale di DNA mitocondriale alterato. Per cui, se è vero che una madre portatrice di un difetto mitocondriale lo trasmette a tutti i suoi figli, non tutti diventeranno sintomatici. Inoltre, se i figli sono sintomatici, la malattia di uno sarà diversa da quella del fratello e dipenderà dalla percentuale di mitocondri affetti.

I soggetti affetti da malattie mitocondriali possono presentare una serie di sintomi da lievi a più gravi. Alcuni bambini nascono mostrando già i segni della malattia, mentre altri appaiono perfettamente normali fino a 2 o a 10-15 anni. Alcuni potrebbero non venire mai a conoscenza della loro malattia perché hanno sintomi molto lievi, mentre altri potrebbero diventare sintomatici nel



TAB. I Principali manifestazioni cliniche di un disordine mitocondriale in età pediatrica

Nel neonato

- ❖ grave pancitopenia con disfunzione pancreatica (sindrome di Pearson)
- ❖ cardiomiopatia ipertrofica con grave neutropenia (sindrome di Barth)
- ❖ nefropatie o epatopatie fatali (sindromi da deplezione del DNA mitocondriale)
- ❖ coma chetoacidotico con disfunzione epatorenale

Nel lattante e nella prima infanzia

- ❖ ritardo psicomotorio
- ❖ iper/ipotonia
- ❖ crisi convulsive
- ❖ nausea e vomito ricorrente
- ❖ diarrea cronica
- ❖ malassorbimento intestinale
- ❖ ritardo di accrescimento
- ❖ mioglobinuria ricorrente-tubulopatia prossimale (sindrome di De Toni-Fanconi)
- ❖ multiendocrinopatia (diabete mellito, ipoparatiroidismo, ipotiroidismo)
- ❖ atrofia ottica e sordità (sindrome di Wolfram)
- ❖ encefalopatia progressiva con e senza convulsioni

giro di 30-40 secondi. Alcuni sono ciechi o sordi, altri no. Alcuni sono mentalmente ritardati, altri no. Alcuni hanno tremori, convulsioni, atassia, altri no. Alcuni devono nutrirsi per gavage, altri possono alimentarsi normalmente. Alcuni hanno test di laboratorio anormali con elevati livelli di acido lattico e di piruvato o bassi livelli di carnitina, altri no. Alcuni deteriorano velocemente e muoiono, altri molto lentamente, altri non deteriorano affatto e sembrano migliorare nel tempo.

Virtualmente tutti i tessuti, a eccezione dei globuli rossi e della cute, sono dipendenti dal metabolismo aerobico per il mantenimento delle loro funzioni biologiche.

Pertanto, la presentazione di un disordine mitocondriale è particolarmente proteiforme.

Nel bambino, accanto alle patologie a carico del SNC (convulsioni, atassia, crisi lipotimiche, neuropatia ottica, retinopatia, sordità neurosensoriale) e del muscolo scheletrico (gravi miopatie infantili precoci da deficit isolato di Cox) - entrambi tessuti a elevata richiesta energetica - vi sono spesso quadri atipici con coinvolgimento prevalente o esclusivo di altri organi.

Le principali manifestazioni cliniche in età pediatrica sono schematizzate nelle **tabelle I e II**, mentre le indicazioni per un inquadramento diagnostico dei disordini mitocondriali sono riportate in **figura 1** e nella **tabella III**.

PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

Le malattie mitocondriali sono piuttosto comuni in età pediatrica; pertanto, oltre al miglioramento della diagnosi, è necessario sviluppare strategie efficaci per il trattamento.

La supplementazione con **cofattori** fornisce qualche beneficio ai pazienti rallentando la progressione della malattia. I più utilizzati sono il menadione (vitamina K3: 40-160 mg/die) e l'ubiquinone (coenzima Q: 80-300 mg/die).

Una **dieta** con elevato contenuto di grassi può essere utile nel trattamento dei pazienti con difetti di piruvato deidrogenasi, mentre una dieta a basso contenuto di grassi è importante nel trattare pazienti con deficit dell'ossidazione degli acidi grassi.

Per il futuro si spera di poter utilizzare anche per queste malattie la **terapia genica**.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Negli ultimi anni i progressi riguardo le malattie mitocondriali sono stati particolarmente rapidi, in particolare per quanto concerne la conoscenza e l'inquadramento di alcune forme, quali la sin-

TAB. II Frequenza relativa delle principali manifestazioni cliniche mitocondriali in età pediatrica

| | |
|------------------------------------------|-----|
| Retinopatia pigmentaria | +++ |
| Iper/ipotonia | +++ |
| Cardiomiopatia | +++ |
| Ritardo psicomotorio e/o staturponderale | +++ |
| Nausea e vomito | +++ |
| Malassorbimento intestinale | +++ |
| Tubulopatia prossimale | +++ |
| Nefropatia | +++ |
| Anemia sideroblastica | +++ |
| Pancitopenia | +++ |
| Multiendocrinopatia | +++ |
| Difetti di conduzione cardiaca | ++ |
| Miopatia | ++ |
| Crisi convulsive | ++ |
| Pseudoostruzione intestinale | ++ |
| Oftalmoplegia e ptosi | + |
| Neuropatia ottica | + |
| Cataratta | + |
| Atassia | + |
| Neuropatia periferica | + |
| Sordità neurosensoriale | + |



drome di Leigh, la sindrome da deplezione di DNA mitocondriale e i difetti di ossidazione degli acidi grassi.

Il pediatra pratico deve sapere che la diagnosi di queste condizioni può essere difficile e che un accurato inquadramento è altamente dipendente da un elevato indice di sospetto.

L'aumento del lattato ematico viene da molti medici considerato un possibile indice di malattia mitocondriale. Tuttavia, alti livelli di acido lattico possono essere dovuti anche alla modalità di prelievo, che nel lattante o nel piccolo paziente può essere piuttosto difficoltosa. Anche il rapporto lattato/piruvato può risultare aumentato a causa dell'ischemia dell'arto provocata dal laccio emostatico prima del prelievo del campione. Per prevenire questa difficoltà tecnica può essere

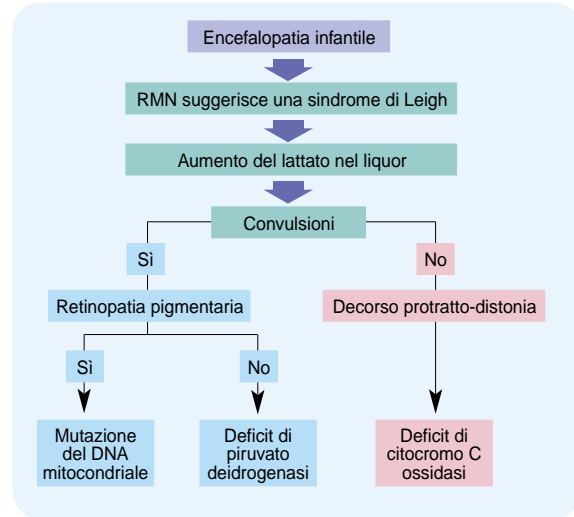


Figura 1 Algoritmo diagnostico per la valutazione di un lattante con encefalopatia primitiva.

utile effettuare un prelievo di sangue arterioso. D'altro canto, una concentrazione normale del lattato ematico si riscontra nella forma a esordio infantile della sindrome da deplezione di mtDNA

e nella sindrome di Leigh dovuta a mutazione puntiforme del mtDNA. Un aumento del lattato nel liquor dovrebbe essere riscontrato in tutti i casi di encefalopatia infantile da malattia mitocondriale. A questo riguardo dovrebbe essere considerato come falso positivo un valore di lattato ematico elevato in presenza di acido lattico liquorale normale. In questi casi la spettroscopia con risonanza magnetica protonica fornirà utili informazioni riguardo il contenuto di acido lattico cerebrale.

TAB. III Protocollo diagnostico dei disordini mitocondriali

SANGUE

- ❖ Acido lattico*
 - ❖ Piruvato
 - ❖ Aminoacidi organici (alanina)
 - ❖ β idrossi-butilirato/ acetoacetato
 - ❖ Dosaggi biochimici (attività enzimatica dei 5 complessi della catena respiratoria)
- ↑ } lattato/piruvato > 1 → alterazione enzimatica della catena respiratoria
 ↑ } lattato/piruvato < 1 → deficit piruvato deidrogenasi
 ↑ → difetto della catena respiratoria
 ↑ → difetti del ciclo di Krebs o piruvato carbossilasi

*Nei casi dubbi può essere utile la valutazione di curve del lattato "dinamiche" (durante e dopo esercizio muscolare o durante il digiuno prolungato o nel periodo post-prandiale).

LIQUOR

- ❖ Acido lattico ↑

MUSCOLO

- ❖ Agobiopsia 50-100 mg di muscolo
- Esame istologico (colorazione tricromica modificata di Gomori → RRF = ragged red fibers)
 Colorazioni istochimiche (SDH, COX, ATPasi)

TEST GENETICI SENSIBILI E SPECIFICI

- ❖ PCR, SSCP, RFLP*, Southern blotting, clonaggio, sequenza mtDNA

INDAGINI STRUMENTALI

- ❖ RMN encefalo: calcificazioni dei gangli basali, anomalie del tronco encefalo, atrofia cerebellare, lesioni malaciche zone posteriori emisferi cerebrali
- ❖ Spettroscopia con fosforo 31 (cervello e muscolo): valutazione attività metabolica ed energetica
- ❖ Elettromiografia

STUDI DI FAMILIARITÀ

PER APPROFONDIRE

Alfred J. Mitochondrial genetics. A clever way to model defects. Nature Reviews Genetics 2000; 1: 84-5.

De Vivo DC, Pons-Rodriguez R, Garcia-Alvarez M. Aggiornamento sulle malattie mitocondriali. Prospettive in pediatria 1995; 25: 305-16.

De Vivo DC. Difetti del DNA mitocondriale: aspetti clinici. In: Di Mauro S, Wallace DC (eds). Il DNA mitocondriale in patologia umana. New York: Raven Press, 1993

Simon DK, Johns DR. Mitochondrial disorders: Clinical and genetic features. Ann Rev Med 1999; 50: 111-27.

*PCR: reazione polimerasica a catena; SSCP: polimorfismi di conformazione del DNA a singola catena; RFLP: polimorfismi di restrizione.