

Basi genetiche della peumopatia cronica interstiziale familiare

Studio familiare dell'*SFTPC*

Genetic basis of familial interstitial chronic lung disease

Familial study of *SFTPC*

Marco Somaschini*, Alessandra Cavazza^o, Silvia Riva*, Isabella Sassi[^],

Paola Carrera**

*Divisione di Patologia Neonatale, Ospedale Bolognini, Seriate (BG). ^oDivisione di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale, Spedali Civili di Brescia. [^] Servizio di Anatomia Patologica IRCCS H San Raffaele, Milano. **Laboratorio di Genetica Clinica IRCCS H San Raffaele, Milano.

Parole chiave:

SFTPC; polmonite interstiziale; pneumopatia cronica interstiziale; surfattante polmonare

Autore cui inviare la corrispondenza

Dr. Marco Somaschini
Divisione di Patologia Neonatale
Ospedale Bolognini
Via Paderno 21
24068 Seriate (BG)
tel 035 3063307/0
e-mail marco.somaschini@bolognini.bg.it

RIASSUNTO

Il deficit di proteina C del surfattante (SP-C) è una patologia rara, descritta per la prima volta da Nogee et al. nel 2001. L'SP-C pare avere un ruolo critico per la funzione polmonare e una sua alterazione può causare una instabilità alveolare con ricorrenti atelettasie, infezioni e successiva fibrosi.

Descriviamo una nuova mutazione (I73T) del gene che codifica per la SP-C (*SFTPC*), che coinvolge la più ampia famiglia mai descritta nella letteratura internazionale affetta da tale patologia. Tale segnalazione permette di confermare la correlazione tra la mutazione del gene che codifica per la SP-C allo sviluppo di una malattia polmonare cronica confermando l'importanza dell'integrità di tale proteina per avere una buona funzionalità polmonare. Tredici membri di tale famiglia su 26 sono affetti dalla mutazione I73T ed hanno sviluppato la malattia con un'espressività clinica diversa ed in età variabile, avvalorando l'ipotesi che si tratti di una patologia a penetranza incompleta con una grande variabilità fenotipica. Esistono probabilmente fattori di natura genetica o ambientale che possono condizionare diversamente l'evoluzione della malattia. Non esistono al momento attuale terapie specifiche di questa condizione, che tuttavia è suscettibile di evoluzione data la sua recentissima scoperta. E' opportuno eseguire l'analisi del gene che codifica per l' SP-C in bambini affetti da polmonite interstiziale idiopatica o fibrosi polmonare idiopatica, soprattutto se nella famiglia sono presenti altri casi di patologia polmonare.

ABSTRACT

Mutations in the gene encoding surfactant protein C (SP-C) *SFTPC* have been found to be associated with chronic interstitial lung disease. A 5 years old girl oxygen dependent from birth and affected by interstitial lung disease (ILD) is heterozygous for a T to C change in exon 3 resulting in the substitution of threonine for isoleucine at codon 73 (I73T), already described in association with ILD. We studied 25 members of her family where the I73T mutation in the SP-C gene is associated to chronic pulmonary diseases. Five members in the mother's family showed respiratory diseases with great diversity in clinical features: her mother was affected by restrictive pneumopathy and emphysema, her grand-mother by asthma and recurrent pneumonia, 2 uncles underwent lung transplantation in the adult age, a aunt was clinically diagnosed having pulmonary fibrosis. All the family members affected by pulmonary diseases and one with no clinical symptoms showed the presence of the mutation I73T. Among the other family members the mutation was found in six subjects for whom no clinical data were available, yet.

Our results confirm that heterozygosity for the mutation I73T may cause chronic inflammation of the lung or progressive pulmonary fibrosis. In addition, the possibility to study a large pedigree allowed us to perform a genotype-phenotype correlation indicating a marked phenotypic variability. The diversity in symptoms, age at onset, clinical course, duration of lung disease in the relatives sharing this mutation indicates an incomplete penetrance of the mutation. This might be due to the influence of other genetic factors thus indicating that the phenotype may be complicated by additional components.

INTRODUZIONE

Le malattie interstiziali polmonari costituiscono ancora oggi una sfida per il medico a causa della complessità di una diagnosi corretta e tempestiva, della gestione terapeutica, dell'imprevedibile variabilità della risposta al trattamento e della prognosi. Le cause sono spesso sconosciute, inoltre il quadro istologico, il decorso clinico e la risposta alle terapie mostrano spesso nel bambino aspetti differenti rispetto allo stesso disordine riscontrato nell'adulto (1).

Numerose patologie possono coinvolgere l'interstizio polmonare con una flogosi cronica e tra queste vengono comprese le polmoniti da aspirazione, le alveoliti allergiche estrinseche, le pneumoconiosi, la proteinosi alveolare, la microlitiasi alveolare familiare, l'emosiderosi polmonare idiopatica, la polmonite da irradiazione e la fibrosi polmonare indotta da alcuni farmaci che agiscono da "primum movens" del danno alveolare (aminoglicosidi, carbamazepina, ciclofosfamide, bleomicina). La flogosi cronica dell'interstizio polmonare può essere inoltre secondaria a disprotidemie, a patologie linfoproliferative e a numerose patologie autoimmuni caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi non organo-specifici. Le forme idiopatiche costituiscono però la maggior parte del gruppo e sono state definite utilizzando principalmente un criterio istologico (2,3).

In sintesi si può affermare che il processo infiammatorio alla base delle malattie interstiziali polmonari è scatenato da un insulto iniziale a livello dell'alveolo e delle strutture interstiziali a cui segue un processo riparativo con un grado variabile di fibrosi. La causa iniziale, il meccanismo di propagazione dell'alveolite e della

successiva fibrosi non sono ancora ben chiarite, ma si è visto che la proteinosi alveolare può precedere lo sviluppo della fibrosi. Tra le forme idiopatiche di fibrosi si stima che lo 0.5-2.2% abbiano una base genetica e quindi un'incidenza familiare. E' da qui che è nata l'ipotesi che in forme familiari di fibrosi polmonare con vario grado di proteinosi alveolare sia coinvolta una anomalia della sintesi di surfattante, in particolare un deficit ereditario di proteine del surfattante, che ne altera la normale funzione biofisica e conduce all'accumulo alveolare di proteine e di lipidi (4). In letteratura sono stati riportati recentemente casi di deficit di proteine B e C del surfattante (SP-B e SP-C) ad incidenza familiare.

Il deficit ereditario di SP-B è una malattia autosomica recessiva che comporta l'incapacità di produrre surfattante normalmente funzionante; i neonati affetti presentano insufficienza respiratoria grave e decesso entro il primo anno di vita. (5,6).

Il deficit di SP-C è stato descritto per la prima volta da Nogee nel 2001 (4). Riportiamo i risultati dell'analisi del DNA per le mutazioni del gene che codifica per la SP-C (*SFTPC*) in una bambina affetta da malattia cronica polmonare familiare e in 25 suoi familiari.

CASO CLINICO

La piccola Maria nasce alla 33^a settimana di età gestazionale da parto cesareo per ritardo di crescita intrauterino e preeclampsia materna, indice di Apgar 7/8, peso

neonatale 1.600 gr. Nelle ore successive alla nascita la neonata presenta distress respiratorio; viene quindi posta prima in CPAP nasale, quindi in ventilazione meccanica per 17 giorni e successivamente vengono somministrate 2 dosi di surfattante esogeno. Fin dai primi giorni di vita si è evidenziata ossigenodipendenza, situazione che è andata gradualmente consolidandosi nonostante siano stati praticati 4 cicli di terapia con steroidi. Alla dimissione, a 2 mesi di vita, la piccola necessitava di supplementazione di ossigeno ma si alimentava spontaneamente; nei successivi 2 mesi ha presentato 2 gravi episodi di bronchiolite uno dei quali ha richiesto la ventilazione meccanica e dai 6 mesi di vita ha accusato 1-2 episodi al mese di infezione delle basse vie respiratorie trattati con antibiotico terapia. Durante gli episodi infettivi la bambina ha presentato notevole difficoltà dell'alimentazione per cui è stato necessario nutrirla mediante gavage. Nel primo semestre e nell'ultimo trimestre del secondo anno di vita la piccola è stata sottoposta a terapia antibiotica continuativa associata ad ossigenoterapia (1.5 L/min con nasocannule) ed a terapia aereosolica con cortisone e broncodilatatori. Nel terzo anno di vita gli episodi infettivi respiratori sono stati meno frequenti, persisteva comunque ossigenodipendenza con fabbisogno di 2 L/min per mantenere saturazioni di O₂ del 93%. Alla fine del terzo anno di vita si evidenziavano segni di iniziale cuore polmonare, veniva iniziata pertanto terapia digitalica. Le radiografie del torace più volte ripetute nel corso dei 3 anni evidenziavano un prevalente diffuso stato enfisematoso con aree di addensamenti e di atelettasie. I 3 anni successivi hanno mostrato un andamento clinico sovrapponibile ai precedenti fino ad arrivare ad una aumentata dipendenza dall'ossigeno di 5 L/min, veniva quindi iniziata assistenza

respiratoria notturna con BiPAP attraverso mascherina nasale ma ottenendo una risposta variabile ed incostante. L'esame spirometrico evidenziava un FEV1 pari al 20% del normale per l'età. La scintigrafia polmonare mostrava delle piccole zone subsegmentarie di ipoperfusione in entrambi i polmoni, i valori di quantificazione relativa di perfusione mostravano un 53% a destra ed un 47% a sinistra. La TAC polmonare evidenziava un marcato ispessimento dell'interstizio ed ipoventilazione con addensamento importante a livello del segmento apicale del lobo inferiore a sinistra e la presenza di numerose piccole bolle periferiche. A causa della grave insufficienza respiratoria a 6 anni di età la piccola veniva sottoposta a tracheostomia percutanea e messa in lista per eseguire il trapianto polmonare.

La bambina è stata inizialmente sottoposta ai test per la mucoviscidosi con esito negativo. Successivamente è stato studiato il gene *SFTPC* che ha evidenziato una mutazione consistente in una transizione di una singola base T>C su un allele che causa la sostituzione della treonina con l'isoleucina sul codone 73 della proproteina (indicata come I73T). La presenza della mutazione I73T ha consentito di confermare che l'insufficienza respiratoria della piccola potesse essere dovuta ad una alterazione della produzione di SP-C.

MATERIALI E METODI

Nella bambina affetta da pneumopatia e nei 25 membri appartenenti alla sua famiglia è stata effettuata l'analisi molecolare sul DNA genomico estratto dai linfociti del sangue periferico.

La ricerca di mutazioni a livello dell'*SFTPC* è stata effettuata attraverso l'amplificazione di sequenze di DNA genomico dei soggetti mediante PCR (polymerase chain reaction) e successiva analisi diretta di sequenza.

I prodotti della PCR e le reazioni di sequenza sono stati purificati mediante piastre monouso 96-wellfilter MultiScreen-PCR (Millipore) e G50 Multiscreen TM-HV (Millipore) rispettivamente, su un sistema "liquid handling" Multiprobe II HT-EX (Perkin Elmer).

Il sequenziamento è stato effettuato con il kit Dye Terminator Cycle Sequencing su un 3100-AB Automatic sequencer (Applied Biosystems).

L'esame immunohistochimico è stato effettuato su tessuto polmonare fissato in formalina utilizzando anticorpi contro SP-B e SPC.

STUDIO DEI FAMILIARI

L'anamnesi familiare ha rilevato un'alta incidenza di pneumopatia interstiziale. Venticinque membri appartenenti a questa famiglia sono stati testati per la ricerca della stessa mutazione, tredici sono stati trovati positivi e tredici negativi; tre persone non sono state testate perchè decedute ma la mutazione è stata trovata nella diretta discendenza di uno di essi; tre componenti non sono stati sottoposti all'esame.

Due membri affetti dalla mutazione sono stati sottoposti a biopsia polmonare, l'esame immunohistochimico su tessuto polmonare ha evidenziato la presenza di SP-C.

Dall'anamnesi è emerso che la nonna materna ha avuto 12 figli viventi e 2 aborti, dei nati vivi 2 maschi ed 1 femmina, tutti nati con peso maggiore di 3.000 gr, sono deceduti tra i 4 e i 6 mesi perchè affetti da pneumopatie interstiziali gravissime e fin dal 2° mese di vita presentavano un arresto della crescita ponderale. La paziente verso la sesta decade di vita ha sviluppato una fibrosi polmonare progressiva con cardiopatia ischemica ed ipertensione arteriosa ed è deceduta dopo circa 10 anni. La madre della bambina è affetta da enfisema polmonare e pneumopatia restrittiva di grado moderato; nel corso dei primi 5 mesi di vita è stata ossigenodipendente, ha presentato spesso infezioni respiratorie ricorrenti ed ha avuto gravi problemi alimentari per cui è stata alimentata per gavage fino a 18 mesi. All'età di 10 anni è stata sottoposta ad accertamenti radiologici cardiaci e polmonari che mostravano enfisema diffuso associato a ridotta vascolarizzazione polmonare; l'esame spirometrico evidenziava ipoventilazione di tipo misto con air trapping. Una sorella materna fin dai primi anni di vita ha accusato gravi problemi polmonari e successivamente è stata posta diagnosi di fibrosi polmonare interstiziale reticolo-micro-nodulare. Un fratello ed una sorella materna sono affetti dalla patologia ma hanno sviluppato solo lievi sintomi respiratori come alcuni episodi di polmonite nell'infanzia e successivamente asma allergico; i loro figli risultati eterozigoti per la mutazione hanno un'età compresa fra 5 e 20 anni e godono di buona salute. Un altro dato importante è la presenza di 2 cugini della nonna materna che sono stati

sottoposti a trapianto polmonare nella sesta decade di vita per insufficienza polmonare in seguito a fibrosi polmonare interstiziale; uno di questi è stato anche sottoposto a trapianto di fegato ed è deceduto per complicanze post-operatorie.

Tutti i componenti familiari non affetti dalla mutazione non hanno mai lamentato sintomi respiratori degni di nota.

DISCUSSIONE

La mutazione I73T del gene SFTPC è stata identificata in una bambina affetta da malattia polmonare cronica e in 12 suoi familiari che presentano sintomi respiratori con espressività diversa e in età variabile, mentre nessun familiare senza la mutazione ha presentato sintomatologia respiratoria. Si è notato che più precoce è l'esordio della malattia, maggiore è la gravità del quadro clinico e rapida è l'evoluzione verso l'insufficienza polmonare cronica. La presenza di diversi quadri patologici che condividono la stessa mutazione dimostra che la malattia si può manifestare in diversi modi e che ci troviamo quindi di fronte ad una patologia genetica a penetranza variabile. Ci potrebbero essere inoltre delle variabili esterne che influenzano la gravità del quadro clinico, come infezioni virali o altri fattori ambientali o genetici.

Il deficit di SP-C è stato descritto per la prima volta da Noguee et al. nel 2001 in una bambina affetta da malattia cronica polmonare e con familiarità positiva per interstiziopatia, in cui è stata identificata una mutazione nel gene della SP-C; la

stessa mutazione è stata riscontrata in seguito nella madre. Entrambi i membri della famiglia non hanno avuto alcun problema respiratorio alla nascita ma hanno sviluppato una malattia polmonare interstiziale successivamente. La mutazione del gene SP-C è stata identificata su uno solo degli alleli sia nella bambina che nella madre (sostituzione di A con G sulla prima base dell'introne 4, C460+1 G→A). Si tratta quindi di una modalità di trasmissione di tipo autosomico dominante, sebbene non sia escluso che mutazioni nascoste possano essere presenti su altri alleli (4).

Successivamente Amin et coll. riportano tre casi di malattia interstiziale polmonare ad incidenza familiare in cui i soggetti presentano un decorso clinico, un quadro radiologico ed istologico sovrapponibile. L'analisi del lavaggio broncoalveolare ha evidenziato l'assenza di SP-C matura ed una riduzione dei livelli di SP-A e SP-B. La biopsia polmonare ha evidenziato la presenza di pro-SP-B, SP-A e SP-D mentre è risultata marcatamente ridotta la presenza della pro-SP-C negli pneumociti di tipo II°, suggerendo un deficit selettivo di espressione o di produzione di SP-C. L'analisi del DNA non ha però identificato una mutazione nell'*SFTPC* ipotizzando che tale deficit possa essere correlato ad una alterazione a livello trascrizionale o post-trascrizionale. Anche se l'analisi del DNA non ha evidenziato mutazioni nel gene *SFTPC*, gli autori ipotizzano la presenza di mutazioni in regioni del gene non indagate, quali la regione promotrice, le regioni introniche o 3' non tradotte, che potrebbero portare ad alterazioni trascrizionali o post-trascrizionali (7). Un altro contributo alla descrizione di questa nuova patologia è dato da Thomas e coll. che riportano una nuova mutazione del gene della SP-C nei membri appartenenti ad una numerosa famiglia con un'alta incidenza di interstiziopatie polmonari. L'analisi del DNA ha evidenziato

una mutazione eterozigote a livello dell'esone 5 in cui vi è una sostituzione di leucina con glutamina a livello della regione carbossi-terminale della proSP-C (L188Q); questa regione ha un ruolo cruciale nella regolazione della sintesi e della secrezione della proSP-C a livello del reticolo endoplasmatico.

I membri appartenenti a questa famiglia mostrano un quadro clinico molto variabile a seconda dell'età di esordio della malattia che include soggetti dalla prima infanzia fino alla quinta decade di vita. In età pediatrica i pazienti mostrano un quadro di polmonite cellulare non specifica mentre gli adulti un quadro di polmonite interstiziale classico; altri soggetti in cui è stata individuata la mutazione non presentano alcun sintomo (8).

Questi casi dimostrano che la SP-C è importante per mantenere una normale funzione polmonare ed un suo deficit o una sua anomalia può essere associato ad una malattia interstiziale polmonare. I meccanismi fisiopatologici della malattia non sono ancora completamente noti. Studi sperimentali sui topi in cui è stato inattivato il gene della SP-C attraverso tecniche di ingegneria genetica sviluppano una patologia polmonare durante la crescita e nell'età adulta (9) caratterizzata da enfisema, displasia delle cellule epiteliali, infiltrazione di cellule monocitiche, aumento di cellule muscolari lisce e accumulo anormale di lipidi. Tali alterazioni sono simili ma non identiche a quelle viste in pazienti con malattia interstiziale polmonare idiopatica ed aumentavano con l'avanzare del tempo suggerendo che il danno è causato da processi lesivi e riparativi insorti successivamente. Il surfattante alterato potrebbe causare un'instabilità alveolare a bassi volumi polmonari con atelettasia, danno da shear-stress e infiammazione, simile a quanto si verifica nella polmonite (10). Si è visto

inoltre che il polmone è infiltrato da macrofagi alveolari atipici contenenti numerose inclusioni lipidiche e cristalli in modo proporzionale al grado di fibrosi alveolare .

La malattia polmonare interstiziale ha inoltre delle analogie con l'epatite osservata in bambini con deficit di α 1-antitripsina dove c'è un accumulo di alfa1-antitripsina nel reticolo endoplasmatico degli epatociti che causa cirrosi epatica (11). Il fatto che un familiare della bambina da noi osservata sia stato sottoposto a trapianto polmonare ed epatico può suggerire l'esistenza di un'interrelazione tra diversi organi.

Le mutazioni dell'*SFTPC* sono di riscontro molto recente, la loro prevalenza non è conosciuta e andrebbero ricercate nei bambini affetti da polmonite interstiziale o fibrosi polmonare idiopatica, soprattutto se nella famiglia sono presenti altri casi di patologia polmonare.

Il nostro studio evidenzia come la mutazione I73T dell'*SFTPC* sia associata a polmonite cronica e sia stata individuata in 13 membri di una famiglia di 26 individui, la più numerosa finora riportata nella letteratura. Tale mutazione sembra avere una penetranza incompleta e causare una grande variabilità del fenotipo. Altri fattori ambientali o genetici non ancora conosciuti potrebbero condizionare l'età d'insorgenza e la gravità della malattia.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Rigante D, Stabile A. Le malattie croniche dell'interstizio polmonare in età pediatrica. Riv Ital Pediatr (IJP) 1999; 25:138-144.
- 2 Katzenstein AL and Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis (Clinical relevance of pathologic classification). Am J Resp Crit Care Med 1998; 157(4): 1301-1315.
- 3 Costabel U. Idiopathic interstitial lung disease in childhood. Riv Ital Pediatr (IJP) 2002; 28: 9-11.
- 4 Nogee LM, Dunbar AE, Wert SE, Askin F, Hamvas A and Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. N Engl J Med 2001;344:573-579.
- 5 Nogee LM, deMello DE, Dehner LP, Colten HR. Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. N Engl J Med 1993; 328: 406-410.
- 6 Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal disease in multiple kindreds, J Clin Invest 1994; 93: 1860-1863.

- 7 Amin RS, Wert SE, Baughman RP, Tomashefski JF, Nogee LM, Brody AS, Hull WM and Whitsett JA. Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease. *J Pediatr* 2001;139(1):85-92.
- 8 Thomas AQ, Lane K, Phillips J 3rd, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd JE. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(9):1322-8.
- 9 Glasser SW, Burhaphs MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, Ikegami M. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98; 6366-71.
- 10 Glasser SW, Detmer EA, Ikegami M, Na CL, Stahlman MT, Whitsett JA. Pneumonitis and emphysema in SP-C gene target mice. *J Biol Chem* 2003; 278 (16): 14291-98.
- 11 Nogee LM. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Ann Rev Physiol* 2004; 66: 601-23.

Tabella 1

Pedigree semplificato della famiglia, dalla prima alla quarta generazione. Il caso clinico è indicato da una freccia.

□ maschio ○ femmina + deceduto

Figura 1

Radiografia del torace a 6 anni: iperinflazione diffusa dei campi polmonari con accentuazione della trama interstiziale, cardiomegalia

Dati comunicati al 19th International Workshop on Surfactant
Replacement, Vienna, June 4-7, 2004