

Costanzo Moretti
Professore di Endocrinologia
Patologia Sistemica II
Dipartimento di Medicina Interna
Università di Roma TorVergata
moretti@med.uniroma2.it

PROGETTO di SVILUPPO

Piattaforma di formazione ed assistenza per patologie rare ad alto impatto sulla disabilità

Malattie endocrine genetiche ad alto impatto sulla disabilità

ABSTRACT

Creazione di una piattaforma strutturata per fornire informazioni, assistenza e formazione di personale specializzato per gestione e trattamento di disordini endocrino-genetici

Sinopsi

I **disordini endocrino-genetici rari** possono essere generati da diversi meccanismi primi fra tutti le alterazioni numeriche e strutturali nella costituzione dei cromosomi (**citogenetiche**), valutabili attraverso esame del cariotipo, e le mutazioni che coinvolgono un singolo locus genico (**mendeliane**). Questo progetto è rivolto alla creazione di una piattaforma operativa in grado di sviluppare una corretta informazione su queste patologie, formare personale in grado di assisterle in termini di impatto psicologico e sociale, assicurare assistenza sanitaria ambulatoriale di elevato livello tecnico-strumentale per la gestione in cronico dei soggetti affetti e dei loro familiari.

Validità Scientifica

Il progetto prevede di giovare di esperienze di personale universitario ed ospedaliero già dedicato alle singole patologie dunque in grado di gestire l'utilizzo della diagnostica e delle diverse associazioni farmacologiche in grado di curare le patologie in oggetto. Il personale di comprovata esperienza si dovrà occupare della formazione di personale specializzato uniformando le metodologie ai più rigidi criteri internazionali di **good quality practice**, gestendo una cartella clinica in rete ed un sito web che includerà la possibilità di accesso agli archivi delle mutazioni, e che darà accesso a informazioni filtrate provenienti dalle rispettive associazioni dei pazienti affetti. La metodologia di gestione della piattaforma sarà rigorosa e prevederà una accurata conduzione clinica con caratterizzazione degli elementi che costituiscono le singole sindromi avvalendosi di metodiche di citogenetica e genetica molecolare per lo studio del cariotipo e della espressione dei geni coinvolti, e delle più sofisticate strumentazioni dedicate al *follow-up* ambulatoriale.

Importanza del programma in termini di collegamento internazionale

Esiste una assoluta carenza negli indirizzi di *follow-up* per la gestione di alcune espressioni cliniche di patologie endocrino-genetiche rare. In particolare, superata la fase neonatale e pediatrica, nel corso della quale esse vengono diagnosticate e nel corso della quale vengono stabiliti i trattamenti essenziali, nella fase adolescenziale e dell'adulto sono rari i Centri in grado di fornire adeguata assistenza ed informazione, ed i pazienti affetti sono dispersi nei Centri Specialistici che si occupano in generale di patologie endocrine. Considerando il fatto che si tratta di patologie rare la piattaforma potrà acquisire standard di gestione entrando in rete con analoghe piattaforme estere acquisendo informazioni e fornendo informazioni al fine di adeguarsi a linee guida internazionali e fornendo direttive anche ad organi che si devono occupare della qualità della vita dei disabili affetti.

Ricadute per l'attività di sviluppo della qualità di vita del disabile affetto

Attualmente le informazioni sulla gestione delle patologie rare endocrino-genetiche in particolare nell'adulto, al di là di quelle prese nei Centri di Eccellenza di endocrinologia pediatrica e di genetica medica, vengono acquisite sul web senza filtri che ne assicurino la qualità. Inoltre per le singole patologie sono scarsamente visibili i settori di competenza esistenti presso Ospedali ed Università Italiane ed Estere che si occupano in modo superspecialistico delle singole patologie. Le stesse associazioni dei pazienti affetti non hanno sufficienti informazioni sugli standard internazionali adottati e non sono collegati con centri esteri gemelli per la verifica della qualità dei criteri utilizzati nella gestione della qualità della vita dei pazienti affetti. Il progetto si propone dunque di stabilire collegamenti internazionali e di assistere in termini di qualità della vita i soggetti affetti da queste patologie.

Costanzo Moretti
*Professore di Endocrinologia
Patologia Sistemica II
Dipartimento di Medicina Interna
Università di Roma TorVergata
moretti@med.uniroma2.it*

PRINCIPALI PATOLOGIE INTERESSATE AL PROGETTO E SETTORI DI INTERESSE

1. GENETICA DEL DIABETE TIPO I
2. GENETICA MOLECOLARE DEI DISORDINI DELLA CRESCITA LEGATI A DIFETTI NELL'ASSE GH-IGF-I
3. DISORDINI DELLA DETERMINAZIONE E DIFFERENZIAZIONE SESSUALE
4. NEOPLASIE ENDOCRINE FAMILIARI (MEN-I e MEN II)
5. SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO FAMILIARE (HAIR-AN)
6. DIABETE INSIPIDO CONGENITO
7. DISORDINI DELLA SUB UNITA' BETA DELLE GLICOPROTEINE IPOFISARIE
8. DISORDINI GENETICI DELL'AZIONE DELL'ORMONE PARATIROIDEO
9. RESISTENZA AGLI ORMONI GLICOCORTICOIDI E MINERALCORTICOIDI
10. SINDROMI DA RESISTENZA AGLI ANDROGENI (CAIS E PAIS)

Costanzo Moretti
Professore di Endocrinologia
Patologia Sistemica II
Dipartimento di Medicina Interna
Università di Roma TorVergata
moretti@med.uniroma2.it

BACKGROUND

Lo straordinario sviluppo delle tecnologie molecolari ha fatto crescere in modo esplosivo le conoscenze di genetica, consentendo di definire le basi molecolari di numerose malattie a ereditarietà mendeliana, di identificare determinanti genetici di patologie complesse e di far luce su alcuni aspetti delle neoplasie.

Come in altre aree della medicina anche in endocrinologia gli studi genetico-molecolari si sono inizialmente concentrati su patologie a ereditarietà mendeliana. I risultati delle indagini sui geni via via identificati hanno consentito non solo di identificare le alterazioni causa della patologia (confermando diagnosi già effettuate sul piano clinico), ma anche di definire la correlazione genotipo/fenotipo, ovvero l'associazione di una particolare alterazione genica (mutazione) a diverse manifestazioni della patologia, nonché di determinare le frequenze delle mutazioni in una popolazione. Per alcune forme di patologia, considerando che solo una frazione di pazienti presentava mutazioni nel gene candidato, questi studi hanno stimolato l'identificazione e la ricerca di nuovi geni implicati nella patologia e consentito, successivamente, una riclassificazione dei pazienti sulla base dei risultati molecolari. Queste informazioni hanno dunque consentito di stabilire trattamenti diversificati e regole di follow-up più specifiche, fornendo dunque informazioni più dettagliate alle famiglie affette.

Tests genetico-molecolari nelle patologie endocrine

Con il termine “**test genetico-molecolari**” si identifica un insieme eterogeneo di prove in grado di caratterizzare in endocrinologia malattie genetiche a ereditarietà mendeliana, malattie complesse, neoplasie endocrine. Queste prove vengono ovviamente integrate con esami clinici biochimici e strumentali che possono essere eseguiti in un **Centro di Endocrinologia-Genetica**. Gli approcci tecnici, così come le implicazioni etiche e psicosociali di ogni prova, dipendono dalla ragione per cui le si esegue. È chiaro che l'analisi di un singolo gene non può che dare risposte inerenti quel gene, di conseguenza patologie molto simili, ma causate da alterazioni di geni diversi, possono essere testate solo analizzandoli tutti, con evidenti problemi di costi. Deve dunque essere affrontato il problema della spesa sanitaria : per effettuare richieste il più congrue possibile è perciò fondamentale personale che conosca a fondo le singole malattie. La conoscenza della genetica della malattia (tipo di ereditarietà e gene/i implicati) consente di valutare le possibilità ed i limiti del tipo di indagine fornita dal laboratorio al fine di non creare false aspettative e di poter informare in modo accurato le persone a cui viene proposto. Il consenso informato nei test genetici ha una serie di implicazioni etiche e psicologiche tali che si consiglia di fare riferimento al consensus europeo per una trattazione dettagliata. La evoluzione nella endocrinologia genetico-molecolare è molto veloce e praticamente ogni mese vengono descritti in letteratura nuove tecniche dunque la richiesta o l'interpretazione di un test genetico può divenire una sfida ardua anche per lo specialista più attento, perciò la comunicazione bidirezionale tra il clinico e il laboratorio, aiutata dalla consulenza dei genetisti medici, è in questo campo ancora più essenziale che in ogni altro.

Nelle malattie mendeliane a gene noto i test genetici vengono eseguiti nei soggetti affetti per confermare un dato clinico o per aiutare una diagnosi differenziale, quindi per identificare la causa genetica della patologia. Quando possibile, la mutazione identificata nel probando viene ricercata nei familiari, sia per una corretta caratterizzazione molecolare (verificare se si è originata “*de novo*” e, per le patologie autosomiche recessive, stabilire quali mutazioni sono presenti sull'allele paterno e quali sul materno), sia per accertare lo stato di portatore. Per patologie a insorgenza postnatale/tardiva (tra cui possono rientrare anche alcuni tumori ereditari tipo MEN), possono essere identificati soggetti presintomatici oppure, nel caso dei MODY, in cui la severità del diabete varia a seconda del gene alterato, i test genetici sono utili per la valutazione dell'evoluzione della malattia. Nelle malattie mendeliane a gene ignoto è possibile valutare il rischio di ricorrenza se sono noti marcatori associati alla malattia. In tutti i casi in cui sia necessario ottenere una grande quantità del tratto da analizzare, si utilizza la tecnica della PCR, in grado di moltiplicare in modo esponenziale la quantità di DNA compresa tra 2 estremi, attraverso una serie ripetuta di cicli. Il prodotto di PCR può costituire il risultato definitivo di un test e può costituire la base di indagini ulteriori: la ricerca di mutazioni puntiformi note (ASO, ARMS, RFLP), lo *screening* di frammenti con variazioni di sequenza (DHPLC e DDGE), il sequenziamento diretto per identificare ogni variazione di sequenza indipendentemente dal significato clinico. Per la valutazione di riarrangiamenti medio-grandi si utilizzano invece tecniche più indaginose, come il Southern blotting, l'array CGH, la FISH.

Costanzo Moretti
Professore di Endocrinologia
Patologia Sistemica II
Dipartimento di Medicina Interna
Università di Roma Tor Vergata
moretti@med.uniroma2.it

UNA PIATTAFORMA IN GRADO DI FORNIRE UN *DAY-HOSPITAL* DI QUALITÀ ENDOCRINO-GENETICO

La piattaforma per la gestione di pazienti affetti da patologie rare endocrino-genetiche con elevato impatto sulla disabilità è progettata sulla base della *Free Standing Unit* americana, un edificio distaccato dall'Ospedale a livello strada, congegnato con tutti i più moderni criteri di abbattimento delle barriere architettoniche, con ampi spazi di recettività e finalizzato ad offrire un servizio solo diurno. In questa Unità vengono organizzate delle zone di lavoro dedicate alla informazione sul web e vengono allestiti i reparti di lavoro destinati alla ospitalità diurna. Il *day-hospital* rappresenta infatti un modello assistenziale ed organizzativo che si adatta in modo ideale alle necessità del paziente con endocrinopatie rare in quanto consente di migliorare da un lato la multidisciplinarietà dell'intervento sanitario, contenendone i costi, e dall'altro di contribuire a razionalizzare la gestione a lungo termine della sua patologia.

Nella letteratura medica internazionale con il termine di *day-hospital (dh)* ci si riferisce alla possibilità clinica, organizzativa ed amministrativa di effettuare interventi sanitari (videat clinici+procedure diagnostiche e/o terapeutiche invasive e seminvasive) su pazienti che vengono poi dimessi nella stessa giornata di accettazione. Una serie enorme di studi statistici ed epidemiologici dimostrano i vantaggi del *dh* per il paziente, di ordine psicologico e sociale, anche perché esso è in grado di ridurre i tempi di attesa e di svolgimento degli algoritmi diagnostico terapeutici.

L'Endocrinologia è una branca della Medicina Interna estremamente dinamica. I meccanismi di controregolazione (*feedback*) intrinseci nel sistema endocrino servono ad assicurare che l'equilibrio della secrezione ormonale sia mantenuto. Il significato ultimo della cura del paziente affetto da endocrinopatie genetiche è il ritorno alla stabilità di questi equilibri modificati dalla patologia.

Seguendo i modelli organizzativi inglesi ed americani, il *dh* in Endocrinologia rappresenta un modello operativo per il 90% circa delle patologie endocrine attive a basso grado di complicazione. Esso consente di :

- Attuare, mediante una adeguata selezione dei pazienti ed una specifica organizzazione, un modello di assistenza che risulti di aumentata efficacia rispetto a quello tradizionale, in particolare in caso di patologie che per la loro gestione necessitano di prove dinamiche di stimolazione ed inibizione e nelle condizioni in cui i risultati di queste prove debbano essere interpolati con quelli di altre prove di diagnostica per immagini e strumentale.
- Erogare, di conseguenza, un'assistenza migliore a pazienti affetti da patologie endocrine impegnative, di cui è necessario conoscere in modo preciso lo stato dell'arte della malattia in corso.
- Ridurre i tempi di attesa riferiti al giudizio diagnostico ed alle strategie terapeutiche.
- Facilitare i pazienti e le loro famiglie soprattutto da un punto di vista psicologico e sociale.
- Razionalizzare, ed in molti casi contenere, il costo dell'assistenza medica.
- Creare una informazione in tempo reale per affetti e loro familiari

Importante chiarire il fatto che nessun programma di *dh* può essere attuato se non vi è il convincimento e la partecipazione dei medici e degli psicologi interessati, del personale paramedico e degli stessi pazienti e dei loro familiari.

Gli elementi chiave dai quali dipende il successo del *dh* endocrino sono sei:

1. Attenta pre-selezione (ambulatoriale) della patologia endocrina.
2. Selezione dei pazienti in relazione alle condizioni generali e di età.
3. Selezione dei pazienti in relazione alle patologie genetiche di cui sono affetti ed ai fattori familiari e logistici.
4. Corretta organizzazione ed informatizzazione degli ambienti di lavoro.
5. Coordinazione dell'attività sanitaria (medici specialisti, psicologi, tecnici ed infermieri).
6. Coinvolgimento diretto di sezioni ultraspecialistiche.

Particolare rilievo nel progetto in esame è svolta attività di Diagnostica di Laboratorio e conseguentemente nella gestione dei protocolli genetico-molecolari e degli algoritmi di gestione clinica. Il Laboratorio di Endocrinologia Molecolare è costituito da zone di sterilità totale, camere sterili e camere fredde ed interagisce e si giova della interazione

Costanzo Moretti
Professore di Endocrinologia
Patologia Sistemica II
Dipartimento di Medicina Interna
Università di Roma TorVergata
moretti@med.uniroma2.it

in tempo reale con le altre unità operative della Piattaforma. Tutti i gli operatori devono avere una esperienza consolidata nella gestione dei protocolli di diagnosi e terapia delle patologie endocrino-genetiche. Innanzi tutto viene prestata attenzione nella pubblicazione e diffusione di protocolli ed algoritmi diagnostici debbono essere uniformati agli standard internazionali per essere in grado di fornire informazioni che possono essere acquisite da parte degli operatori amministrativi e paramedici dedicati alla organizzazione della informazione in rete e (in loco) degli appuntamenti, in particolare riguardanti la preparazione agli esami, il programma delle prove dinamiche e la pianificazione dell'intervento di altri reparti. Il *turnover* di un elevato numero di pazienti può essere assicurato grazie alla diponibilità da parte della Piattaforma nel fornire aree di attesa che non debbono in molti casi necessariamente essere stanze di degenza. L'alto grado di informatizzazione nella gestione clinica di protocolli diagnostico-terapeutici in Endocrinologia è riflesso dalla competenza del personale medico e paramedico nell'attento sviluppo degli studi programmati. La piattaforma si propone per coordinare dunque il lavoro di tutte le unità interne che quotidianamente si interfacciano con il lavoro del *db* in particolare proveniente da:

- Laboratorio di Citogenetica ed Endocrinologia Molecolare (impianto computerizzato per esame del cariotipo, sala PCR , ricerca di mutazioni puntiformi note (ASO, ARMS, RFLP), *screening* di frammenti con variazioni di sequenza (DHPLC e DDGE), sequenziamento diretto per identificare ogni variazione di sequenza indipendentemente dal significato clinico. Southern blotting, array CGH, FISH
- Laboratorio analisi (ematologia, coagulazione, chimica clinica, immunometria, microbiologia, genetica, seminologia)
- Radiologia (ecografia, ecodoppler, risonanza magnetica nucleare, tomografia assiale computerizzata, densitometria + *radiologia interventistica* : agoaspirati ecoguidati/ biopsie/prelievi venosi in cateterismo)
- Sale mediche specialistiche
- Neurologia (potenziali evocati, elettromiografia)
- Chirurgia (neurochirurgia/chirurgia oncologica)
- Oncologia (protocolli diagnostico/terapeutici)
- Psicoterapia

Il significato di questa affiliazione deriva dalla necessità di condividere con medici provenienti da altre discipline le decisioni cliniche nell'attuazione dei protocolli concordati per una ottimizzazione del costo-beneficio.

Particolare cura è rivolta ai protocolli di indagine di Laboratorioche prevedono **prove dinamiche di stimolazione ed inibizione**. I protocolli sono in massima parte programmati con schede di pianificazione diurne. Le principali prove dinamiche attuabili nel *db* di endocrinologia molecolare riguardano lo studio della ipofisi anteriore e posteriore ed altri tests di uso comune.

ALCUNI ESEMPI DI APPLICAZIONI

La **iperplasia surrenale congenita** è una patologia autosomica recessiva (1/11.000 nella sua **forma classica**, 1/5000 nella sua **forma non-classica**) causata da mutazioni (che generano **deficit di 21 idrossilasi**) del gene CYP21A2 (cromosoma 6), arrangiato in tandem con il corrispondente pseudogene, che ha il 98% di omologia di sequenza. L'accuratezza nell'analisi di questo gene dipende perciò dalla capacità di discriminare tra il gene e lo pseudogene. Per la valutazione dei grandi riarrangiamenti la tecnica più in uso è tuttora il Southern blotting, ma si stanno sviluppando tecniche alternative tra cui la MLPA. Questa patologia nelle sue differenti forme di espressione provoca in molti soggetti affetti genitali ambigui. Per la ricerca delle mutazioni puntiformi le tecniche di *screening* presentano in questo caso specifico alcuni inconvenienti: è difficile sospettare un fenomeno di allele dropout o una delezione/larga conversione in eterozigoti, per cui si preferisce il sequenziamento di tutto il gene poiché consente di sospettare tali situazioni a fronte di una omozigosità totale o parziale di una regione. Con un solo passaggio si possono perciò evitare falsi positivi/negativi e identificare tutte le mutazioni, comprese le rare o nuove. In questa patologia, inoltre, non è infrequente trovare soggetti con più di 2 mutazioni. Poiché il fenotipo è determinato dall'allele con la mutazione più lieve (la gravità dipende dal grado di attività enzimatica residua) è fondamentale verificare la loro distribuzione sui 2 alleli attraverso l'analisi dei genitori. Il sequenziamento consente inoltre di valutare i polimorfismi intragenici, in modo da verificare la segregazione degli alleli familiari (dato utile nel caso di

Costanzo Moretti
Professore di Endocrinologia
Patologia Sistemica II
Dipartimento di Medicina Interna
Università di Roma TorVergata
moretti@med.uniroma2.it

gravidezze future soprattutto con partner diversi). In questa patologia il trattamento in utero con desametasone, fondamentale per prevenire la virilizzazione dei genitali esterni nelle bambine di famiglie a rischio e iniziato appena accertata la gravidanza, viene interrotto in caso di cariotipo maschile, ma l'analisi molecolare sugli stessi villi coriali consente l'interruzione della terapia anche nei feti femmina non affetti.

Tra i casi in cui la diagnostica molecolare si è dimostrata utile per la diagnosi differenziale, rientrano le **ambiguità genitali** neonatali causate da **deficit di 5- α reduttasi** o da **totale (CAIS) o parziale insensibilità agli androgeni (PAIS)**. A lungo è stato ritenuto che esse si potessero distinguere sulla base dei valori del rapporto T/DHT, ma le analisi molecolari del gene del recettore degli androgeni e di quello della 5- α reduttasi hanno mostrato in alcuni neonati con valori normali del rapporto T/DHT l'assenza di mutazioni nel primo e la presenza di mutazioni inattivanti nel secondo. Questi studi, dimostrando che in età prepubere alcuni valori ormonali possono non essere indicativi o sufficienti, hanno stimolato la revisione dei protocolli diagnostici e suggerito l'analisi molecolare del gene SRD5A2 alla luce sia delle scelte cliniche (chirurgiche e terapeutiche) necessarie per l'attribuzione del sesso, sia del diverso tipo di ereditarietà (autosomica recessiva vs X-linked) di queste patologie.

Il **deficit di GH severo** in cui lo studio mediante RM della regione ipotalamo-ipofisaria non abbia evidenziato anomalie morfologiche di rilievo, viene valutato attraverso l'identificazione di lesioni molecolari nei diversi geni dello sviluppo ipofisario e si è rivelata utile per la diagnosi precoce di deficit ormonale multiplo consentendo l'ottimizzazione del *follow up* e della terapia. Negli *screening* neonatali i test biochimici mantengono tuttora il miglior rapporto costo/beneficio, poiché le tecnologie molecolari possono testare su spot di sangue solo un certo numero di mutazioni ricorrenti e non riescono a coprire l'intero spettro mutazionale di una patologia. Per le applicazioni su larga scala è necessario perciò attendere l'evoluzione dei *microarray*, mentre nelle malattie complesse in cui sono stati identificati aplotipi di suscettibilità l'applicazione diagnostica è tuttora in fase sperimentale.

CONCLUSIONI

Una **piattaforma strutturata per fornire informazioni, assistenza e formazione di personale specializzato per gestione e trattamento di disordini endocrino-genetici** presenta diverse caratteristiche e finalità, cui corrispondono importanti implicazioni etiche, sociali, legali. Poiché simili modelli di gestione vengono ormai proposti da molti Centri Universitari ed Ospedali, ci preme sottolineare l'importanza di curare un aspetto sinergico a questi che è quello della informazione in rete e della integrazione dei servizi psicoterapeutici e di follow-up in cronico di pazienti che, portatori di queste patologie, presentano stadi di disabilità di vario grado. Affidarsi a centri in cui gli standard qualitativi e quantitativi siano garantiti dalla specializzazione del personale, dalle opportune certificazioni di qualità, nonché dalla completezza nel tempo di prestazioni che sono mirate alla qualità della vita, rappresenta la principale proposta operativa di questo progetto. Con il progredire delle acquisizioni scientifiche, necessaria una base coordinata da un moderno laboratorio di citogenetica ed endocrinologia molecolare per consentire test genetici che riguarderanno sempre più tratti complessi anziché semplici, la cui sfera di rilevanza si sposterà dalla famiglia all'individuo, considerando in particolare che in seguito al follow-up pediatrico si aggiungerà quello della vita adulta, e dunque alle finalità diagnostiche e di prevenzione si aggiungeranno quelle della determinazione del rischio e predittive. La metodologia si sposterà dunque dall'analisi di cromosomi e geni all'analisi del menoma o del proteoma, la terapia (convenzionale o genica) sarà sempre più "mirata" sul paziente, e la piattaforma operativa potrà avere come base di lavoro quello della corretta informazione e della interazione con i Centri Esteri nel secolo della medicina molecolare.