



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Scienze e Biotecnologie Mediche Sperimentali Applicate.

Indirizzo: Genetica e fisiopatologia del danno cardiovascolare nelle malattie endocrinometaboliche.

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S.)

Settore Scientifico Disciplinare: MED/09.

CORRELAZIONE TRA FEBBRE MEDITERRANEA FAMILIARE, MALATTIA DI FABRY E GENOTIPI DI SAA1

IL DOTTORE
CATERINA BARTOLOTTA

IL COORDINATORE
PROF. CARLA GIORDANO

IL TUTOR
PROF. ROSARIO SCAGLIONE

CO TUTOR
PROF. GIOVANNI DURO

CICLO XXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

1. FEBBRE MEDITERRANEA FAMILIARE	pagina 3
1.1 MANIFESTAZIONI CLINICHE	pagina 10
1.2 CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO	pagina 15
1.2.1 AMILOIDOSI E SAA	pagina 18
1.3 DIAGNOSI	pagina 23
1.4 TERAPIA	pagina 26
2. MALATTIA DI FABRY	pagina 27
2.1 MANIFESTAZIONI CLINICHE	pagina 30
2.2 DIAGNOSI	pagina 38
2.3 TERAPIA	pagina 44
3. OBIETTIVI DELLO STUDIO	pagina 46
4. MATERIALI E METODI	pagina 48
5. RISULTATI	pagina 54
6. DISCUSSIONE	pagina 63
7. BIBLIOGRAFIA	pagina 68

1 LA FEBBRE MEDITERRANEA FAMILIARE

La Febbre Mediterranea Familiare [1] appartiene, dal punto di vista nosologico al gruppo delle Sindromi Autoinfiammatorie (Autoinflammatory Disease-AID), costituendo il prototipo delle Febbri Periodiche di origine genetica. E' una patologia a trasmissione autosomica recessiva dovuta a mutazioni nel gene MEFV che mappa sul cromosoma 16p13.3 e codifica una proteina, la pirina anche definita "Marenostrina".

La pirina è espressa soprattutto nel citoplasma di cellule della linea mieloide (monociti maturi, neutrofili, eosinofili), ma anche in cellule dendritiche e fibroblasti.

Tale proteina gioca un ruolo importante nella regolazione della produzione e secrezione di talune citochine infiammatorie [2], come l'IL-1 β [3], che agisce come regolatore negativo dell'apoptosi.

La Pirina è una proteina costituita da 781 aminoacidi ed è composta da quattro domini: il dominio pirina N-terminale (PYD); il B-BOX *zinc finger*; il dominio centrale *coiled-coil*; il B30.2 C-terminale [4]. Ciascuno di questi domini effettua interazioni proteina-proteina specifiche (Figura 1).

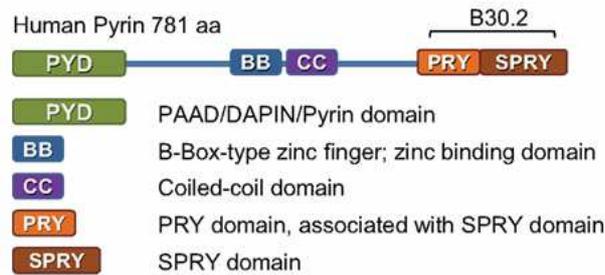


Figura 1. Struttura della Pirina

Il primo dominio PYD ha un ripiegamento di tipo *death-fold domain* (sei α -eliche anti-parallele) attraverso il quale la proteina forma legami omotipici con altre proteine all'interno di un complesso macromolecolare denominato "inflammasoma".

Il dominio C-terminale B30.2 è codificato dall'esone 10 del gene MEFV e le mutazioni in questa sede sono di solito associate ad un fenotipo severo di Febbre Familiare Mediterranea (M694V, M694I e M680I). Anche la mutazione V726A ricade nel dominio B30.2 e determina un fenotipo lieve della malattia. Tuttavia, la presenza della mutazione V726A in associazione alla M694V o M680I correla con lo sviluppo di un fenotipo clinico severo.

La pirina, inoltre, contiene dei domini di localizzazione nucleare (NLS) nel dominio centrale, per cui la si può ritrovare tanto nel citoplasma quanto nel nucleo. Infatti, in risposta a meccanismi di trasduzione del segnale, si verifica la migrazione

della proteina dal citoplasma al nucleo attraverso i pori nucleari e la pirina si comporterà come regolatore intranucleare della trascrizione di peptidi infiammatori, prendendo così parte ai processi infiammatori mediati dai neutrofili [5].

Attualmente, la funzione della pirina e l'impatto delle sue mutazioni sono ancora oggetto di discussione. Nel 2003, Touitou et Al. [6] hanno dimostrato che i pazienti affetti da FMF hanno una ridotta trascrizione del gene MEFV rispetto ai soggetti sani. Pertanto, la fisiopatologia della FMF potrebbe dipendere da un difetto quantitativo di espressione dell'mRNA di MEFV.

La scoperta dell'inflammosoma [7] ha aperto nuove prospettive sulla patogenesi delle sindromi auto- infiammatorie. In condizioni normali, l'interazione proteina-proteina determina l'attivazione di eventi complessi, che portano alla formazione e quindi al rilascio di citochine tra cui l'IL-1 β . Questo meccanismo è alla base della fisiopatologia delle sindromi auto-infiammatorie.

Nella FMF, le mutazioni a carico della pirina causerebbero un'eccessiva produzione di IL-1 β , anche in risposta a stimoli di lieve entità.

Per quanto attiene al ruolo del dominio B30.2 è ancora tutt'oggi dibattuto; Kastner e Stojanov [4] hanno dimostrato che questo dominio, in condizioni normali, inibisce la produzione della forma attiva di IL-1 β , pertanto, mutazioni nel dominio B30.2 porterebbero ad una eccessiva produzione di IL-1 β .

Tschopp et Al. [8] hanno dimostrato che il dominio B30.2 della pirina interagisce con diverse componenti dell'inflammosoma, ovvero con NALP-3 (anche chiamato criopirina, la proteina mutata nelle criopirinopatie o CAPS), con la caspasi-1 e con il loro substrato, la pro-interleuchina (IL)-1 β .

Gli autori hanno dimostrato che l'over-espressione di un costrutto della pirina privo del dominio B30.2 in cellule HEK239T over-esprimenti la pro-IL-1 β e la pro-caspasi-1 determina l'assenza di inibizione della IL-1 β . Pertanto si conclude che questo dominio fa sì che la pirina sia una proteina modulatrice dell'attività di diverse proteine coinvolte nella formazione dell'inflammasoma.

Non a caso, la maggior parte delle mutazioni del gene MEFV coinvolgono il dominio C-terminale B30.2 della pirina. Normalmente questa regione lega e inibisce l'attività catalitica delle subunità p20 e p10 della caspasi-1, pertanto le tre maggiori

mutazioni a questo livello riducono l'efficacia di tale legame e, quindi, l'azione inibitrice sulla caspasi [9].

Il gene responsabile della FMF, MEFV, è costituito da dieci esoni con una lunghezza pari a 15 Kb. Fino ad oggi sono state descritte più di 200 mutazioni a carico di esso (*Infevers* <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/index.php>; *HGMD*[®] <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=MEFV>), anche se in molti casi non è sempre possibile stabilire una correlazione genotipo – fenotipo [10].

La maggior parte delle mutazioni descritte cade nell'esone 10 tra gli aminoacidi compresi tra i codoni 680 e 761, le più diffuse delle quali sono: M680I, M694V, M694I E V726A. Oltre ad esse, diverse mutazioni sono state identificate negli altri esoni e si tratta generalmente di mutazioni puntiformi di tipo *missense* (Figura 2).

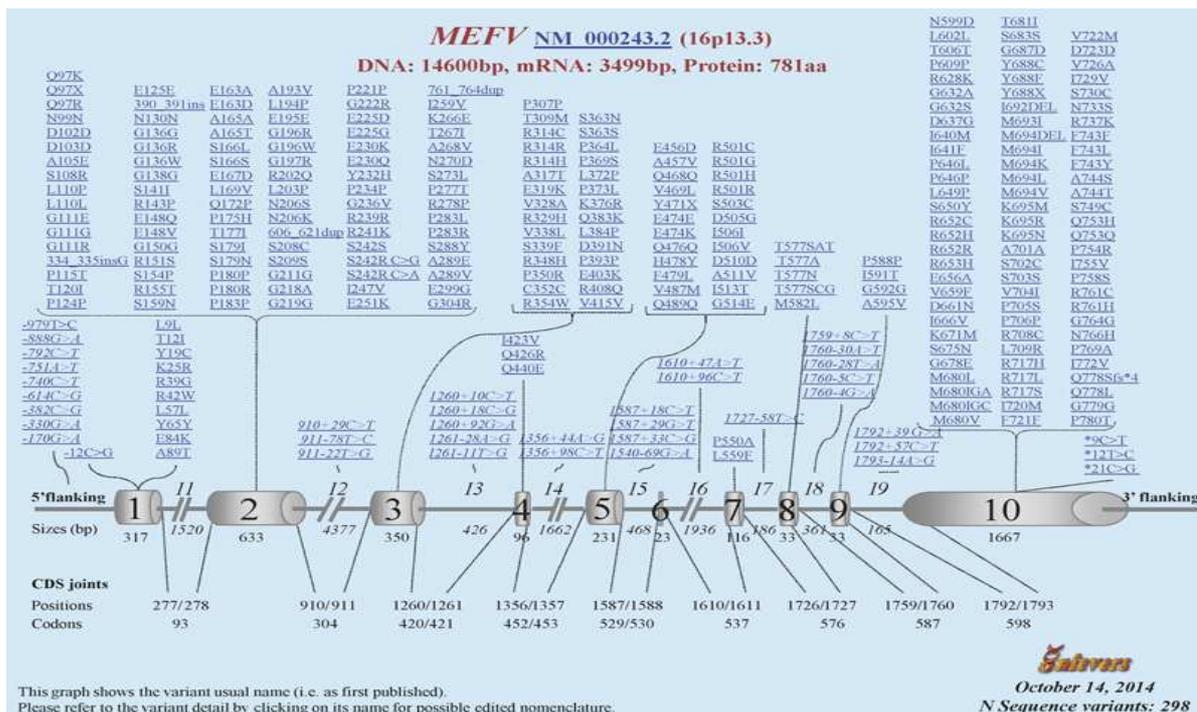


Figura 2 Schema varianti MEFV (Infevers: an online database for autoinflammatory mutations. Copyright.)

Quattro popolazioni sono considerate a più alta prevalenza di FMF (1:200 e 1:1000): ebrei non-Ashkenaziti, Turchi, Armeni e Arabi. Il Mediterraneo sud-orientale è considerato il luogo di distribuzione “originale” della malattia, tuttavia, la migrazione delle popolazioni generalmente colpite ha favorito la diffusione della FMF dal Mediterraneo orientale ad aree geografiche più ampie [11].

Recenti studi hanno ampliato il numero delle popolazioni colpite dalla FMF compresa l'Unione Europea, tra cui gli italiani e i greci. Infatti, il registro *Eurofevers* (<http://www.printo.it/eurofever/>), che raggruppa pazienti di ben

76 centri in 31 paesi dell'Europa e del Mediterraneo orientale, ha identificato almeno 60 casi di febbre periodica in pazienti con origine esclusivamente europea, con molti altri casi da confermare [12]. Questi pazienti hanno caratteristiche simili a quelle dei pazienti dell'area orientale del Mediterraneo, sebbene valutazioni approfondite mostrino una malattia meno severa rispetto a questi ultimi, suggerendo così come l'ambiente abbia effetti sull'espressione fenotipica della malattia [13].

In aggiunta agli europei, sono stati riportati ben 292 casi di FMF in Giappone; anche questi pazienti hanno caratteristiche cliniche simili agli altri, ma l'esordio sembra essere più tardivo [14].

Infine, si riportano alcuni casi anche in Brasile.

1.1 MANIFESTAZIONI CLINICHE

La febbre costituisce il sintomo cardine della malattia, e varia tra i 38 °C e i 40 °C, ha una durata media di 12-72 ore, non è responsiva alla terapia antibiotica e va incontro a risoluzione spontanea(Figura3).

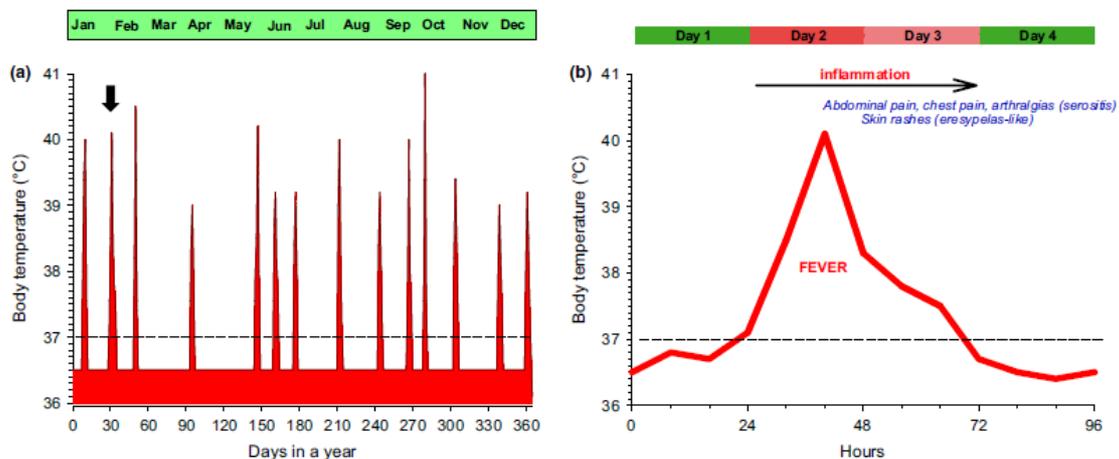


Figura 3 Esempio di profilo temporale degli attacchi di febbre durante l'anno (a) e del singolo attacco febbrile nelle ore (b).

Gli episodi febbrili in genere si associano a dolore addominale (95%), mentre il dolore toracico è descritto nel 33-53% dei casi.

L'episodio acuto febbrile associato a dolore addominale può mimare un quadro clinico simile all'addome acuto, ma anche in questo caso la risoluzione dei sintomi è in genere spontanea [15].

Nel 25-60% dei casi gli episodi febbrili esordiscono prima dei dieci anni di vita, nel 64-95% prima dei venti anni.

Da uno studio clinico condotto da *Padeh et al* in un'ampia casistica pediatrica israeliana, l'esordio della malattia al di sotto dei 2 anni, rispetto alla fascia di età 2-16 anni, era caratterizzato da episodi febbrili senza altri sintomi associati o solo dolore addominale [16].

Il dolore addominale può essere localizzato e poi diffuso. Quando l'infiammazione coinvolge il peritoneo posteriore può mimare una colica renale o una malattia infiammatoria pelvica (PID). Per tale motivo, è stato stimato che circa il 30-40% dei pazienti, non prontamente diagnosticati, possano essere sottoposti ad interventi chirurgici "inutili" come appendicectomia e/o colecistectomia, senza risoluzione dei sintomi. Durante l'attacco i pazienti lamentano alterazioni dell'alvo tra cui stipsi e/o diarrea, mentre la diarrea predomina in età pediatrica.

Tuttavia, è fondamentale distinguere episodi dolorosi associati agli attacchi acuti della FMF da quelli dovuti ad altre cause.

Il coinvolgimento articolare è stato descritto in circa 1/3 dei pazienti. Le artralgie sono più frequenti dei quadri di artrite e di solito coinvolgono le articolazioni medio- grandi tra cui caviglie e ginocchia. Diversi casi di sacroileite sono stati descritti, con

negatività dell'antigene HLA-B27 [17]. Gli episodi acuti di dolore articolare possono essere scatenati da traumi lievi e/o sforzo fisico. I pazienti con artrite ricorrente hanno un rischio tre volte maggiore di sviluppare amiloidosi rispetto ai pazienti senza coinvolgimento articolare [15].

La mialgia febbrile protratta è una manifestazione rara delle forme severe di FMF, si caratterizza per la presenza di dolori muscolari, febbre, alterazioni dei test di laboratorio e ha una durata variabile (1-6 settimane).

Il dolore toracico è in genere espressione dell'interessamento delle sierose e, quindi, si possono presentare casi di pleurite e/o pericardite.

La diagnosi differenziale si pone essenzialmente con la pericardite ricorrente idiopatica [18] dove la colchicina si è dimostrata molto efficace come trattamento standard.

Per quanto riguarda il coinvolgimento cutaneo, stimato intorno al 40% dei pazienti, si manifesta sotto forma di erisipela, ovvero manifestazioni eritematose, calde, sporgenti, del diametro compreso tra 10-15 cm situate in genere nella parte posteriore delle ginocchia, caviglie e piedi [19].

Anche se il coinvolgimento renale è più frequentemente associato ad amiloidosi, lesioni renali non amiloidi sono state descritte, come la glomerulonefrite mesangiale proliferativa, glomerulonefrite fibrillare, quadri vasculitici con interessamento renale come *Poliarterite Nodosa* e la *porpora di Schönlein-Henoch*.

Nei periodi intercritici il paziente è di solito asintomatico.

La più importante complicanza a lungo termine è l'amiloidosi. Tra gli ebrei sefarditi e turchi, la FMF rappresenta la principale causa di amiloidosi. In meno dell'1% dei pazienti l'amiloidosi può rappresentare l'esordio della FMF.

La localizzazione è prevalentemente renale associata a proteinuria persistente o ingravescente, fino a veri e propri quadri di sindrome nefrosica ed insufficienza renale cronica [15].

La deposizione di fibrille si può verificare anche in altri siti, come l'intestino, il cuore, le ghiandole endocrine, la milza e il fegato. L'incidenza di amiloidosi renale si è ridotta in maniera drastica dopo l'introduzione della colchicina. Di recente, l'incidenza delle manifestazioni extrarenali dell'amiloidosi è aumentata in seguito ad un incremento della sopravvivenza tra i

pazienti con amiloidosi renale (trattati con dialisi o trapianto). La diagnosi è basata su segni clinici.

Altre manifestazioni cliniche comprendono splenomegalia, cefalea (15%).

Gli esami di laboratorio mettono in evidenza una spiccata neutrofilia ed incremento della VES.

Dal 1997 il gene MEFV è oggetto di studio ai fini della conferma diagnostica.

1.2 CORRELAZIONE GENOTIPO - FENOTIPO

La correlazione genotipo-fenotipo nei pazienti affetti da FMF è molto variabile e non sempre agevole. Da quanto riportato dai dati in letteratura [20] (Figura 4), la presenza delle mutazioni M694V ed M680I in condizione di omozigosi e/o eterozigosi composta si associano ad un fenotipo clinico di tipo severo con età di esordio dei sintomi clinici precoce, amiloidosi, artrite. La E148Q, una delle cinque mutazioni più frequenti del gene MEFV, è stata associata ad un fenotipo clinico di tipo “mild”. Inoltre, poiché la E148Q è presente in un’alta percentuale di *carriers* (>10%) e non sempre provoca un fenotipo FMF, neanche se in omozigosi, alcuni ricercatori la classificano come polimorfismo[21].

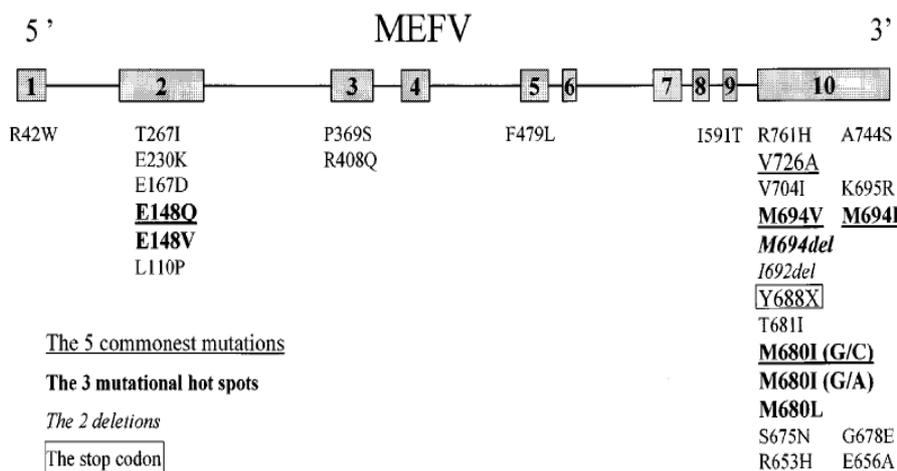


Figura 4. Descrizione mutazioni del gene MEFV.

Vista la natura autosomica – recessiva della FMF va sottolineato che individui con diagnosi clinica di FMF dovrebbero avere due mutazioni.

Tuttavia, è stato descritto in letteratura [21], che circa 1/3 dei pazienti portatori di una singola mutazione, presenta un quadro fenotipico “compatibile” con FMF e sono responsivi al trattamento con colchicina. Varie sono le ipotesi fornite dai ricercatori per spiegare l’assenza di una seconda mutazione in una malattia autosomica recessiva: gli attuali metodi di laboratorio non sono in grado di identificare la seconda mutazione; l’allele privo di mutazione può non essere in grado di funzionare a causa di meccanismi epigenetici; esistono polimorfismi a carico di geni codificanti proteine della cascata infiammatoria; le condizioni ambientali favoriscono il fenotipo clinico in individui con una sola mutazione.

A sostegno di questa ipotesi riportiamo i dati di un recente studio [22] condotto su 386 pazienti pediatrici, di cui 113 pazienti erano portatori di mutazioni del gene MEFV, 46 erano omozigoti e/o eterozigoti composti, 67 erano portatori di una singola mutazione. Di questi si è cercato di analizzare possibili differenze cliniche individuando cinque genotipi rispettivamente: 1) pazienti portatori

di due mutazioni ad alta penetranza; 2) pazienti portatori di una mutazione ad alta penetranza e di una a bassa penetranza; 3) pazienti portatori di due mutazioni a bassa penetranza; 4) pazienti portatori di una mutazione ad alta penetranza; 5) pazienti portatori di una mutazione a bassa penetranza (Figura 5).

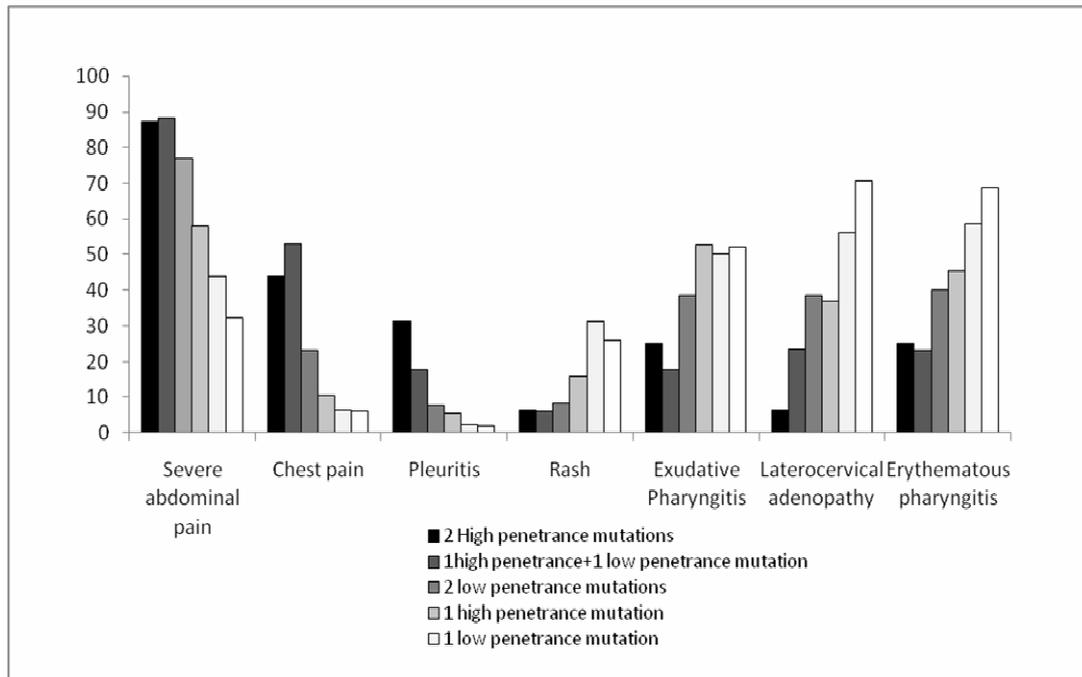


Figura 5 Distribuzione dei fenotipi in base al numero di mutazioni a carico di MEFV.

L'eterogeneità clinica ha consentito di dimostrare la presenza di un quadro clinico "FMF-like" nei soggetti portatori di due mutazioni ad alta penetranza, mentre veniva osservato un quadro clinico "PFAPA-like" nei pazienti portatori di una singola mutazione a bassa penetranza¹.

¹ Federici et al. Validation of the newly developed pediatric criteria for the diagnosis of Familial Mediterranean fever in a large pediatric cohort of western European children with periodic fever. 2011.

L'ipotesi che i soggetti portatori di una singola mutazione del gene MEFV possano avere un'altra mutazione a carico di un secondo gene, che interagendo reciprocamente, possono determinare un quadro fenotipico "*variabile*", è stata avanzata da diversi autori.

E' stato considerato il possibile ruolo di gene modificatore in uno studio condotto su SAA1, che codifica per la siero amiloide A e SAA1 è diventato uno dei pochi esempi di *gene modificatore* negli uomini [23].

1.2.1 AMILOIDOSI AA E SAA

L'amiloidosi sistemica AA è una complicanza a lungo termine di vari disordini infiammatori cronici, tra i quali proprio le sindromi autoinfiammatorie come la FMF [24,25].

Il danno d'organo deriva dal deposito di frammenti proteolitici della proteina di fase acuta Siero Amiloide A sotto forma di fibrille amiloidi,

comunque, solo una piccola parte di pazienti con infiammazione a lungo termine presenta tali complicanze, il che dipende da fattori modificatori della malattia tra i quali il più caratterizzato è il genotipo di SAA1.

Gli organi maggiormente colpiti dal deposito sono reni, fegato e milza.

In più del 90% dei pazienti il quadro clinico esordisce con proteinuria, sindrome nefrosica e/o disfunzione renale. Se non correttamente trattata, l'amiloidosi porta in maniera irreversibile all'insufficienza renale terminale e alla dialisi.

La proteina siero amiloide A è un'importante proteina di fase acuta, i cui livelli sierici aumentano enormemente (da 1-3mg/L a 100-1000mg/L) durante i processi infiammatori di varia natura. Essa viene, infatti, secreta dal fegato sotto il controllo trascrizionale di IL-1 e IL-6.

In condizioni normali, SAA1 svolge azioni benefiche durante la fase acuta:

- Induce la produzione di collagenasi da parte dei fibroblasti sinoviali, favorendo così la riparazione del danno;
- Lega i lipopolisaccaridi batterici favorendone l'eliminazione;
- Inibisce le citochine IL-1 e TNF- α responsabili dell'insorgenza della febbre;

- Sopprime la risposta immunitaria influenzando l'interazione macrofagi-cellule T, modificando la funzione dei linfociti T-helper e, in generale, inibendo i linfociti.

Quando lo stimolo che ha portato alla produzione di SAA1 persiste, come nella febbre mediterranea familiare, la concentrazione di tale proteina può raggiungere una soglia critica che conduce all'aggregazione.

Il catabolismo di SAA1 consiste in eventi di scissione proteolitica multipla ad opera di catepsine e metalloproteasi, infatti viene inizialmente degradata in un prodotto intermedio e poi ulteriormente catabolizzata.

Eventi di digestione non completa, dovuti all'elevata concentrazione della proteina, provocano l'accumulo di peptidi amiloidogenici costituiti dai primi 66-76 aminoacidi sotto forma di fibrille che si depositano a livello degli organi vitali, inficiandone il funzionamento.

Dei quattro geni della famiglia SAA, SAA1 e SAA2 codificano per le proteine di fase acuta, anche se SAA1 rappresenta il 70% di esse.

Tali geni hanno sequenze omologhe e di ciascuno di essi si distinguono varie forme alleliche.

Le forme alleliche di SAA1 differiscono tra loro per due nucleotidi che determinano gli aminoacidi in posizione 52 e 57 della proteina: gli alleli α - β - γ definiscono rispettivamente gli aminoacidi valina52-alanina57, alanina 52-valina57 (condizione *wild - type*), alanina 52, alanina 57.

Vari studi hanno associato una maggiore occorrenza di amiloidosi secondaria in pazienti con FMF che hanno il genotipo α/α di SAA1, ma anche un genotipo α/β [23,26].

In particolare, il rischio di sviluppare amiloidosi secondaria è maggiore in pazienti con mutazioni a carico dell'esone 10 di MEFV (soprattutto M694V omozigote) e con genotipo α/α di SAA1.

Al contrario i genotipi β e γ sembrano avere un ruolo protettivo sullo sviluppo di amiloidosi nei pazienti con FMF. Il motivo di tale comportamento è probabilmente associato a un maggiore uptake dell'isoforma α da parte dei macrofagi, forse tramite un processamento diverso da quello delle varianti β e γ .

Pertanto, il dosaggio della siero amiloide A e lo studio dei genotipi di SAA1 nei pazienti affetti da Febbre Mediterranea Familiare costituiscono un importante strumento valutativo della prognosi, in quanto intraprendere precocemente la terapia a base di

colchicina riduce enormemente il rischio di sviluppare tale complicanza dannosa.

1.3 DIAGNOSI

La diagnosi della Febbre Mediterranea Familiare è prevalentemente una diagnosi clinica.

I criteri diagnostici clinici sono stati identificati dapprima in quelli di Tel-Hashomer [27] (Tabella 1), in cui per la diagnosi definitiva di FMF sono sufficienti due o più criteri maggiori oppure un criterio maggiore ed uno minore.

Major criteria	Minor criteria
Recurrent febrile episodes with serositis (peritonitis, synovitis or pleuritis)	Recurrent febrile episodes
Amyloidosis of AA type without a predisposing disease	Erysipelas-like erythema
Favourable response to regular colchicine treatment	FMF in a first-degree relative

Definitive diagnosis: 2 major or 1 major and 2 minor criteria. Probable diagnosis: 1 major and 1 minor criteria

Tabella 1: Criteri di Tel-Hashomer

Solo nel 2009 Yalçinkaya et Al. [28] (Tabella 2) hanno stabilito i seguenti criteri diagnostici pediatrici:

Criteria	Description
Fever	Axillary temperature of $>38^{\circ}\text{C}$, 6–72 h of duration, ≥ 3 attacks
Abdominal pain	6–72 h of duration, ≥ 3 attacks
Chest pain	6–72 h of duration, ≥ 3 attacks
Arthritis	6–72 h of duration, ≥ 3 attacks, oligoarthritis
Family history of FMF	

Tabella 2: Criteri di Yalçinkaya

Gli episodi acuti di FMF sono associati ad un aumento aspecifico degli indici di flogosi, come l'amiloide sierica A, il fibrinogeno, la VES e proteina C-reattiva, così come un aumento della conta dei globuli bianchi, con negativizzazione durante i periodi intercritici [29].

L'esame chimico-fisico delle urine può rilevare ematuria e/o proteinuria.

Nel corso degli anni, una miriade di citochine, chemochine e altre proteine pro-infiammatorie sono state studiate nei pazienti affetti da FMF. Queste includono l'IL-1, 4, 5, 6, 10, 12, 18, il TNF- α e γ , citochine [30]. associate a recettori, proteine del complemento, molecole di adesione, fattori di crescita, immunoglobuline.

Il quadro complessivo che emerge è che la FMF non è una malattia autoimmune. Pertanto in atto non vi sono test diagnostici di laboratorio e/o strumentali specifici. Anche se sono state descritte più di 200 mutazioni nel gene MEFV, la maggior parte dei casi sono causati da quattro mutazioni *cluster* in un singolo esone: M694V, V726A, M680I e M694I, la cui prevalenza varia secondo la popolazione studiata. Nella popolazione turca, che costituisce il gruppo etnico più numeroso con FMF, la M694V

rappresenta la mutazione più frequente del gene MEFV (51%) seguita dalla M680I (14%) e la V726A (9%).

Complessivamente, circa l'80% dei pazienti affetti da FMF hanno una mutazione identificabile del gene MEFV; il 57% sono eterozigoti composti, il 26% presentano una singola mutazione, mentre il 16% circa non ha mutazione identificabile.

1.4 TERAPIA

Allo stato attuale, la colchicina è la sola terapia efficace, in grado di migliorare la qualità di vita con conseguente riduzione degli attacchi o risoluzione totale.

Diversi autori [31,32] hanno valutato l'impatto della colchicina sull'infiammazione subclinica e sui sintomi durante i periodi intercritici. Hanno, inoltre, documentato un miglioramento della qualità di vita e la negativizzazione degli esami di laboratorio dopo l'uso della colchicina.

La dose terapeutica della colchicina è stabilita in base al peso corporeo: 0,03 mg/kg/die fino ad un massimo di 3 mg/die.

Obiettivo della terapia è quello di prevenire gli attacchi e di controllare l'infiammazione subclinica nei periodi intercritici.

Nei casi non responsivi al trattamento con colchicina o intolleranti al farmaco è possibile impiegare nuovi farmaci tra cui gli inibitori dell'IL-1 di cui si conoscono tre tipologie: 1) Anakinra [33], antagonista del recettore dell'IL-1; 2) Rilonacept, inibitore recettoriale; Canakinumab [34], anticorpo monoclonale, anti - IL-1 β .

2 LA MALATTIA DI FABRY

La Malattia di Fabry (FD) è una malattia da accumulo lisosomiale, ereditaria, X-linked, progressiva e multisistemica, caratterizzata da manifestazioni cliniche e decorso variabili che possono portare alla morte del paziente entro la quinta decade di vita, se non tempestivamente diagnosticata.

La malattia di Fabry è causata da mutazioni nel gene GLA localizzato nel braccio lungo del cromosoma X in regione q21-22 [35], che codifica l'enzima α -galattosidasi A. Ad oggi sono state descritte più di 660 mutazioni nelle regioni codificanti di GLA, in pazienti Fabry (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GLA>). Il deficit funzionale dell' α -galattosidasi A [36] determina un'alterazione del metabolismo di alcuni glicosfingolipidi, prevalentemente il globotriaosilceramide (Gb3), che di conseguenza si accumula nei lisosomi di numerosi tipi cellulari, soprattutto delle cellule dell'endotelio vascolare [37].

L'incidenza è stimata intorno a 1:40.000 [38] nella popolazione generale, sebbene le iniziative di screening neonatale abbiano riscontrato una prevalenza inaspettatamente alta della malattia fino a 1 su ~ 3.100 neonati in Italia [39], ed una

frequenza sorprendentemente alta nei neonati maschi con FD (circa 1 su 1.500) in Taiwan, dove l'86% presentava l'IVS4 919 G>A, una mutazione intronica coinvolta nello splicing alternativo del messaggero precedentemente riscontrata in pazienti con variante tardiva cardiaca della malattia di Fabry [40]. La mutazione intronica IVS4 919 G>A è stata, inoltre, riscontrata in pazienti cinesi affetti da FD con quadri di cardiomiopatia ipertrofica idiopatica [41].

L'attività enzimatica dell' α - galattosidasi A può essere assente o carente per cui si avrà un progressivo accumulo di globotriaosilceramide all'interno dei lisosomi, organelli subcellulari rappresentati in una varietà di strutture cellulari, comprese le cellule endoteliali dei capillari, a livello renale (podociti, cellule tubulari, endoteliali glomerulari, mesangiali, cellule interstiziali), cellule cardiache (cardiomiociti e fibroblasti) e quelle nervose.

Il danno tissutale prende inizio durante l'infanzia, o addirittura, nel corso dello sviluppo fetale; tuttavia, a differenza di molte altre malattie da accumulo lisosomiale, la maggior parte dei pazienti rimangono clinicamente asintomatici durante i primi anni di vita [39].

Nei soggetti affetti da FD, si ritiene che l'accumulo lisosomiale e, quindi, la disfunzione cellulare, andrebbero ad attivare una cascata di eventi tra cui l'apoptosi cellulare, la compromissione del metabolismo energetico, le alterazioni dei piccoli vasi, la disfunzione dei canali ionici a livello delle cellule endoteliali, l'incremento dello stress ossidativo, l'ischemia tissutale, ma, soprattutto, lo sviluppo irreversibile di fibrosi a livello cardiaco e renale.

2.1 MANIFESTAZIONI CLINICHE

I primi sintomi clinici possono manifestarsi durante l'infanzia, di solito tra i 3-10 anni, in genere pochi anni dopo nelle ragazze rispetto ai ragazzi. Con l'età in entrambi i sessi si svilupperà un danno d'organo che porta al suo fallimento, infatti, l'insufficienza renale terminale e complicazioni cardiovascolari o cerebrovascolari limitano le aspettative di vita.

Le manifestazioni cliniche possono essere svariate secondo la fascia di età:

- infanzia: acroparestesie, crisi dolorose precipitate da caldo/freddo e/o esercizio fisico, febbre, aumento della VES, ipo/anidrosi, sintomi gastrointestinali, proteinuria, cornea verticillata, angiocheratoma;
- adolescenza: angiocheratoma, febbre, acroparestesie, disidrosi, insufficienza renale, stroke/infarto/TIA, complicanze polmonari [38].

La forma classica è più rara delle varianti atipiche della malattia, caratterizzate da interessamento di singolo organo e che si presentano principalmente nelle varianti cardiaca, renale e cerebrovascolare.

Le varianti atipiche hanno pochi o nessun sintomo tipico della forma classica della malattia, ma hanno manifestazioni confinate prevalentemente a un organo. Ciò implica che siano spesso individuate “per caso” [42]. A differenza della forma classica, i pazienti con variante atipica hanno un’attività residua compresa tra il 2-20% rispetto al normale e, per questo, la sintomatologia si presenta più tardivamente (quarta-sesta decade di vita).

All’interno delle varianti atipiche è stato descritto un fenotipo intermedio (*Varianti intermedie*) in quei pazienti privi dei segni cardine di FD soprattutto nel periodo compreso tra i 3 e i 6 anni di vita, ma che mostravano cardiomiopatia ipertrofica seguita da progressiva insufficienza renale terminale intorno ai 40 anni[43].

Nell’89% dei casi la FD è destinata a cronicizzare, con tendenza a peggiorare nel tempo. Tra i segni precoci che si manifestano nell’infanzia, e possono protrarsi fino all’età adulta, troviamo il coinvolgimento gastrointestinale descritto nel 30-40% dei casi.

I pazienti in genere lamentano dolore addominale (*post-prandiale*), diarrea, nausea e vomito. Questi sintomi gastrointestinali possono essere legati alla deposizione di Gb3 nei gangli autonomici dell’intestino e dei vasi sanguigni mesenterici.

L'assenza di sudorazione (*anidrosi*) o una minore capacità di sudare (*ipoidrosi*) rappresentano un sintomo clinico comune tra i pazienti.

Dal punto di vista dermatologico [38], la manifestazione clinica più comune è l'angiocheratoma: si tratta di aree di dimensioni variabili, di colorito viola-rossastro, rilevate, tipicamente distribuite sulle natiche, inguine, ombelico e cosce, ma a volte anche su aree mucose, come il cavo orale.

Istologicamente, le lesioni cutanee sono costituite da piccoli angiomi superficiali che aumentano in numero e dimensioni con l'avanzare dell'età e possono essere isolate oppure organizzate in gruppi. Altre manifestazioni cutanee comprendono le teleangiectasie, l'edema sottocutaneo.

Dal punto di vista oftalmologico [38], la FD è caratterizzata da vari segni oculari con coinvolgimento dei vasi congiuntivali e retinici, della cornea e del cristallino tra cui: cornea verticillata, cataratta sottocapsulare posteriore con aspetto “raggiato”, alterazioni di decorso e tortuosità dei vasi congiuntivali, alterazioni di decorso e tortuosità dei vasi retinici.

L'acufene [38], può essere un sintomo precoce così come la riduzione della soglia uditiva è stata segnalata anche in età pediatrica. La progressiva riduzione della soglia uditiva è stata riscontrata nell'80% dei maschi e nel 77% delle femmine quando valutati con i test da stimolo. Nonostante l'assenza di disfunzione d'organo severa, questi sintomi, da soli o in associazione, possono essere causa di morbidità significativa e limitare lo sviluppo psicofisico, l'integrazione sociale e lo svolgimento delle fisiologiche attività.

Le anomalie cardiache possono essere presenti durante l'adolescenza in entrambi i sessi ed essere di vario tipo: alterazioni di conduzione (*ridotto intervallo PR, aritmie, alterata variabilità della frequenza cardiaca, insufficienza valvolare*), ipertensione ortostatica e cardiopatia ipertrofica ventricolare.

La progressione del danno cardiaco può manifestarsi nel giovane adulto con malattia coronarica precoce, ipertrofia ventricolare sinistra "non ostruttiva", valvulopatie [38], (*il prolasso della mitrale è l'alterazione più frequente*).

L'interessamento del microcircolo cerebrale può essere responsabile di quadri ischemici anche in età giovane adulta. Le manifestazioni neurologiche, risultanti dalla compromissione

multifocale del microcircolo cerebrale, possono includere attacchi ischemici transitori (TIA), convulsioni, parkinsonismi, ictus ischemico o emorragico. I primi danni neurologici, inoltre, sono espressione di un coinvolgimento delle fibre nervose somatiche periferiche e del sistema nervoso autonomo. L'inizio dei sintomi correlati si verifica in genere in età più precoce nei maschi che nelle femmine.

Il dolore è uno dei primi sintomi e si può distinguere in: a) crisi episodiche ("*crisi Fabry*") caratterizzate da dolore intenso a carico delle estremità che s'irradia agli arti e altre parti del corpo; b) dolore cronico caratterizzato da bruciore, formicolio, parestesie.

Le crisi dolorose possono essere scatenate da febbre, esercizio fisico, stress, brusche variazioni di temperatura. Quando le crisi sono innescate o accompagnate da febbre, i pazienti di solito presentano anche un aumento del tasso di sedimentazione degli eritrociti. Per tale motivo la FD può essere talvolta *misdiagnosticata* con altre condizioni patologiche tra cui artrite reumatoide, febbre reumatica, febbre mediterranea familiare, fenomeno di Raynaud, lupus eritematoso sistemico (LES) e "*dolori di crescita*".

Il dolore può ridursi come intensità in età adulta, per tale motivo è importante ricercare nella storia di ogni paziente la presenza di acroparestesie durante l'infanzia [38].

Il corso naturale della nefropatia di Fabry nei bambini o negli adolescenti non è ancora in gran parte compreso. Segni indicativi di un precoce danno renale includono lo sviluppo di microalbuminuria e proteinuria già nella seconda decade di vita.

Dal punto di vista istologico [38], cambiamenti irreversibili a carico dei glomeruli, dei tubuli interstiziali e delle strutture vascolari possono essere osservati mediante biopsia renale talvolta prima della comparsa di microalbuminuria.

Una riduzione dell'indice di filtrazione glomerulare (GFR) è rara in età pediatrica mentre è più frequente nell'adolescenza.

Come accade nella maggior parte dei casi, la patologia renale si aggrava con l'età. Le lesioni renali sono secondarie al deposito di Gb3 a carico delle cellule endoteliali glomerulari, mesangiali, interstiziali e nei podociti. L'insufficienza renale si manifesta con microalbuminuria e proteinuria a partire dalla seconda o terza decade di vita.

I segni clinici di coinvolgimento delle vie respiratorie, sono rappresentati da dispnea da sforzo, tosse cronica, asma, e sono frequenti in entrambi i sessi con FD.

In origine, le femmine eterozigoti venivano considerate come "*portatrici del gene difettoso*" e si pensava che non sviluppassero i sintomi della malattia.

In realtà, come riportato dalle diverse segnalazioni in letteratura, anche le donne eterozigoti [44,45] per mutazioni a carico del gene GLA, possono sviluppare un quadro clinico di tipo "*mild*".

I segni e i sintomi clinici variano molto nelle femmine eterozigoti, questa eterogeneità fenotipica può essere in parte dovuta alla "*Lyonizzazione*", processo per cui una delle due copie del cromosoma X è casualmente inattivato in tutte le cellule dell'embrione femminile, in modo che le femmine eterozigoti costituiscano un *mosaico* di cellule normali e mutate in proporzioni variabili[46].

Dunque, nelle malattie genetiche X-linked le femmine eterozigoti possono essere sintomatiche, probabilmente come conseguenza dell'inattivazione non casuale del cromosoma X, che si traduce in una più alta percentuale di espressione in un determinato tessuto del cromosoma X che porta il gene mutato [45].

Nel caso della malattia di Fabry, generalmente, le femmine eterozigoti possono sviluppare danno d'organo a carico di cuore, cervello o reni (*seppur più lentamente rispetto ai maschi*).

Solo occasionalmente sono stati osservati fenotipi "*classici*" di tipo severo come nei maschi. Possono essere presenti sintomi come dolore, ipertensione ortostatica, angiocheratoma, anomalie oculari, coinvolgimento cocleare e, quindi, riduzione della soglia uditiva, sintomi gastrointestinali e coinvolgimento delle vie respiratorie.

L'età mediana d'insorgenza dei sintomi tra le donne è di 13-20 anni.

2.2 DIAGNOSI

La FD è trasmessa come carattere legato al cromosoma X; essa è caratterizzata dal deficit dell'enzima lisosomiale α -galattosidasi A, codificato dal gene GLA (Xq22), il quale è costituito da sette esoni distribuiti su 12.436 paia di basi (bp) [46].

La FD può essere causata da una varietà di mutazioni puntiformi missenso o nonsense, mutazioni di splicing, piccole delezioni o inserzioni, e grandi delezioni. I difetti nel gene che codifica l' α -galattosidasi A sono molto eterogenei, la maggior parte dei quali rendono l'enzima non funzionante.

Polimorfismi a singolo nucleotide, come -30G> A, -12G> A, -10C>T nella regione 5' non tradotta (5'UTR) e la p.Asp313Tyr nell'esone 6 e altre variazioni di sequenza (VNTR) sono stati descritti.

La possibilità che queste ed altre varianti siano vere mutazioni o semplici polimorfismi [47] è ancora oggi oggetto di dibattito.

Più di 660 mutazioni sono state descritte a carico del gene GLA nei pazienti con malattia di Fabry.

Circa il 75% delle alterazioni geniche determinanti la FD è costituito da mutazioni puntiformi “*nonsense*” o “*missenso*”,

inoltre, sono stati descritti anche ampi riarrangiamenti, piccole inserzioni o delezioni, difetti del processo di “*splicing*”, o a carico del codone di “stop”, doppie mutazioni e polimorfismi associati alla malattia.

Le varianti “*atipiche*” del fenotipo emizigote, oligosintomatiche, sono in prevalenza associate a mutazioni puntiformi “*missenso*” che esprimono un’attività residua dell’ α -galattosidasi A.

Il tentativo di prevedere il decorso clinico della malattia corrispondente ad una determinata mutazione genica è, allo stato attuale, estremamente difficoltoso [48]. Un ostacolo alla definizione di correlazioni genotipo/fenotipo è rappresentato dalla continua descrizione di nuove mutazioni del gene GLA.

Un recente studio condotto su 36 famiglie non imparentate ha descritto ventidue nuove mutazioni in altrettanti ceppi familiari (10 “*missenso*”, 3 “*nonsenso*”, 3 difetti di “*splicing*” e 6 piccole inserzioni o delezioni); mentre nelle restanti 14 famiglie è stata rilevata una mutazione già identificata in precedenza.

Mutazioni puntiformi ma anche grosse delezioni sono state individuate a livello della regione intronica. Queste, se coincidono con i siti di *splicing* [49], possono determinare un difetto nel

processamento del pre-mRNA e di conseguenza la formazione di un mRNA anomalo.

Anche la sede delle singole alterazioni geniche ed il tipo di sostituzione amminoacidica determinata, non costituiscono, al momento, criteri orientativi per la prognosi; sono descritte, infatti, mutazioni puntiformi “*missenso*” adiacenti, sulla medesima sequenza codificante ma corrispondenti a quadri clinici estremamente diversi.

Recentemente [38], è stato rilevato il ruolo fondamentale della regione C-terminale dell’ α -galattosidasi A nella regolazione della attività enzimatica. Mutazioni che determinano una singola sostituzione amminoacidica [50] in questa regione sono descritte in varianti “*atipiche*” cardiache della FD, mentre l’interruzione della sequenza amminoacidica nella regione C-terminale, conseguente al “*codone - stop*”, è associata invece ad espressione clinica severa anche negli eterozigoti.

Studi recenti hanno dimostrato, inoltre, che la riduzione dell’attività enzimatica [51] può essere determinata da mutazioni che non incidono direttamente sull’attività stessa ma sono coinvolte nel mantenimento della stabilità strutturale dell’enzima. Queste proteine, non correttamente processate, sono trattenute

nel reticolo endoplasmatico e soggette a degradazione con risultante deficit della concentrazione della proteina.

Importante può essere l'identificazione della varietà di mutazioni determinanti un errato "*folding*" [51] della proteina, per mettere in evidenza che la scorretta struttura può essere patogeneticamente significativa nei quadri clinici della malattia (Figure 4).

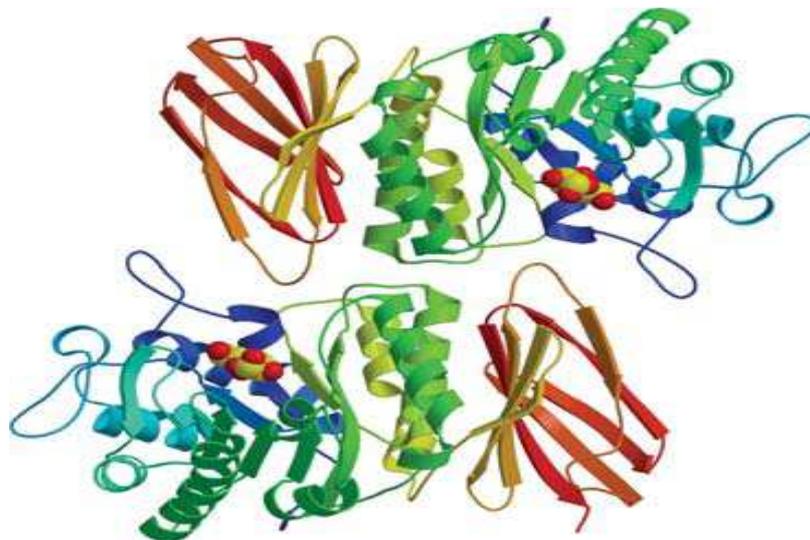


Figura. 6: Struttura conformazionale della proteina enzimatica.

La dimostrazione di una carente attività di α -galattosidasi nel plasma o nei leucociti è il metodo di laboratorio di riferimento che dovrebbe essere sistematicamente utilizzato per confermare la diagnosi clinica di FD nei maschi, in cui il risultato sarà conclusivo[64].

Al contrario, le femmine “*malate*” possono avere un’attività enzimatica che rientra nel range di normalità.

Pertanto, l’analisi del gene GLA che miri all’identificazione di mutazioni responsabili della Malattia di Fabry è essenziale.

Infine, il dosaggio plasmatico del Gb3 è stato anche proposto e utilizzato nella diagnosi biochimica di FD, ma è un metodo che richiede tempo. Nelle femmine, i livelli plasmatici di Gb3 sono generalmente più bassi che nei maschi. Mentre la valutazione dell’escrezione urinaria di Gb3 (Figura 5) è considerata un indicatore più affidabile e chiarificatore nella maggior parte dei pazienti, sia maschi sia femmine.

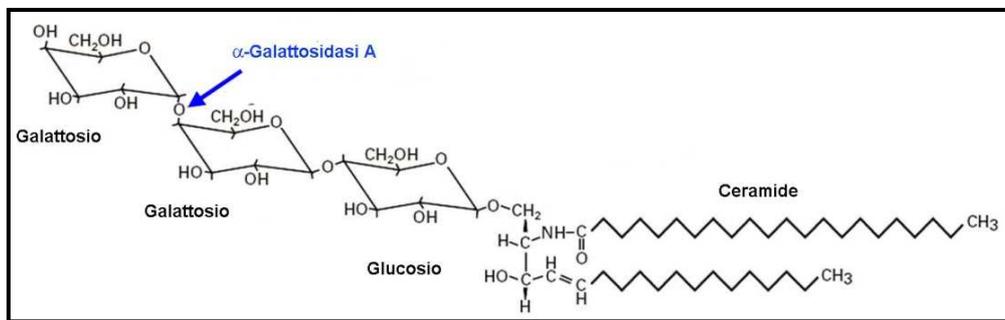


Figura 7: Struttura del Gb3

Tuttavia, sebbene la determinazione dei livelli di Gb3 nel plasma e nelle urine rimanga un’analisi richiesta, non sempre questi correlano con la severità e l’insorgenza delle manifestazioni cliniche. Negli ultimi anni, invece sembrerebbe che il Lyso - Gb3 (Gb3 deacetilato) sia un marcatore molto più attendibile del Gb3

tradizionale in quanto esiste una più chiara correlazione tra i livelli di Gb3 deacetilato e l'insorgenza di sintomi nei soggetti Fabry [52].

2.3 TERAPIA

La terapia sintomatica della FD si avvale dell'impiego di farmaci volti a controllare le crisi dolorose. Se indicata la terapia farmacologica aspecifica (*antiaggreganti, anticoagulanti, antipertensivi, statine*), va proseguita anche quando si fa ricorso alla terapia enzimatica sostitutiva[46, 53] (Figure 8).

Organ/system	Assessment	Guidelines
General	General status, quality of life (SF36® Health survey, EuroQOL or PedsQL® measurement mode), school or work performance, depression, anxiety, drug use, somatic growth	Baseline (at first visit), every 12 months
	Complete physical examination	Baseline, every 12 months
	Genetic counseling	Baseline, on request
	Alpha-galactosidase A activity and genotype	If not previously performed or determined
Kidney	Serum creatinine, ionogram, BUN; morning spot urine for urinary protein/creatinine ratio and albumin/creatinine ratio Urinary Gb ₃ (optional)	Baseline. Every 3 months if CKD stage 1 or 2 and >1 g/day of proteinuria or CKD stage 4 Every 6 months if CKD stage 3 Every 12 months if CKD stage 1 or 2 and <1 g/day of proteinuria
	Cardiac	
	Palpitations, angina Blood pressure, rhythm	Baseline, every 6 months Every evaluation visit
	ECG, echocardiography 2-D with Doppler	Baseline, every 12 months
	Holter monitoring	If an arrhythmia is suspected or palpitations are present
	Cardiac MRI	Every other year
	Coronary angiography	If clinical signs of angina
Neurologic	Acroparesthesias, fatigue, fever, heat and cold tolerance, stroke-related symptoms, TIA	Baseline, every 12 months
	Neurologic examination, questionnaires (Brief Pain Inventory)	Baseline, every 12 months
	Brain MRI without contrast	Baseline At time of a TIA or stroke event In females to document CNS involvement Every 3 years
	Magnetic resonance angiography	If cerebral vasculopathy should be excluded
	Comorbid stroke risk factors: Cholesterol (Total, LDL, HDL), triglycerides, Lpa, total plasma homocysteine	Baseline, every 12-24 months
ENT	Tinnitus, hearing loss, vertigo, dizziness	Baseline, every 6 months
	Audiometry, tympanometry, otoacoustic emissions	Baseline, every 12 months thereafter
Ophthalmologic	General ophthalmologic exam (slit-lamp, direct ophthalmoscopy, best corrected visual acuity, visual fields)	Baseline, every 12-24 months
Pulmonology	Cough, exertional dyspnea, wheezing, exercise intolerance	Baseline, every 12 months
	Spirometry	If clinical signs
Gastrointestinal	Postprandial abdominal pain, bloating, diarrhea, nausea, vomiting, early satiety, difficulty gaining weight	Baseline, every 12 months If symptoms persist or worsen despite treatment
	Endoscopic evaluations	
Skeletal	Bone mineral density, 25(OH) vitamin D levels	Baseline

Figura 8. Trattamento della malattia di Fabry “multi-organo”.

Quest'ultima prevede la somministrazione endovenosa ogni due settimane dell'enzima carente. Gli studi [54] riportati in letteratura hanno dimostrato l'efficacia della terapia enzimatica nel rallentare la progressione del danno renale e cardiaco e nel migliorare i sintomi legati al coinvolgimento del sistema nervoso periferico.

In genere ben tollerata, è stato dimostrato che la terapia enzimatica determina un miglioramento significativo della qualità di vita dei pazienti dopo circa 1-2 anni dall'avvio della terapia con agalsidasi A.

3 OBIETTIVO DELLO STUDIO

Alcuni sintomi clinici della malattia di Fabry (febbre ricorrente, malattia da accumulo renale e dolori addominali) in assenza di un quadro clinico severo, possono essere confusi con quelli di FMF determinando un errore diagnostico di Febbre Mediterranea Familiare e di conseguenza una sottostima della Malattia di Fabry [55]. Per questo motivo, uno degli obiettivi del mio progetto di ricerca è stato quello di dimostrare come, in assenza di un quadro clinico sistemico severo di Malattia di Fabry, la sovrapposizione dei quadri clinici di FD e di FMF possa determinare errori diagnostici così che l'analisi dei geni GLA e MEFV nonché un'attenta anamnesi familiare dovrebbe essere effettuata in tutti quei pazienti con sospetta diagnosi di Febbre Mediterranea Familiare non giustificata dal punto di vista genetico.

Inoltre la correlazione genotipo-fenotipo nei pazienti affetti da FMF è molto variabile e non sempre agevole. Questo è anche dovuto al fatto che circa il 30% circa dei pazienti con sintomatologia FMF-compatibile risultano portatori di una sola mutazione dimostrabile del gene MEFV [56, 57]. L'ipotesi che i soggetti portatori di una singola mutazione del gene MEFV

possano avere mutazioni a carico di un secondo gene è già stata presa in considerazione e il gene SAA1, che codifica per la siero amiloide A, è diventato uno dei pochi esempi di *gene modificatore* negli uomini [23]. Da qui la possibile importanza di “geni modificatori” nel determinare la variabilità clinica nei pazienti eterozigoti per mutazioni del gene MEFV. I geni di altre sindromi auto infiammatorie (MVK, TNFRSF1A, PSTPIP1) sono stati considerati come potenziali modificatori del fenotipo FMF eterozigote, ma tale ipotesi non ha prodotto risultati incoraggianti [58]. Tra le patologie pediatriche però che esordiscono, o che hanno come sintomo frequente, episodi febbrili ricorrenti e manifestazioni gastrointestinali, vi è anche la malattia di Fabry.

Per cui il mio progetto di ricerca si propone **di effettuare l’analisi genetica del gene GLA** in pazienti le cui caratteristiche sintomatologiche non sono chiare.

Alla luce di ciò, abbiamo analizzato i geni *MEFV* e *GLA* in **221** pazienti cui era stata fatta diagnosi clinica di Febbre Mediterranea Familiare. Inoltre, in tali pazienti è stato caratterizzato il gene SAA1 al fine di comprendere se i polimorfismi a carico di tale gene possano influenzare o meno il fenotipo clinico di tali pazienti.

4. MATERIALI E METODI

Abbiamo analizzato **221** pazienti cui era stata fatta diagnosi clinica di Febbre Mediterranea Familiare, 123 donne (età media 7-50 anni) e 98 uomini (età media 5-30 anni).

Estrazione del DNA

Il DNA dei pazienti è stato estratto da sangue intero attraverso un kit di estrazione da colonna (GenElute Blood Genomic DNA Kit, Miniprep, Sigma-Aldrich, USA), e la concentrazione è stata determinata allo spettrofotometro.

Analisi HRM e Sequenziamento

I campioni di DNA sono stati sottoposti ad analisi High Resolution Melting (HRM) con il sistema Light Cycler 480 (Roche Applied Science, Germany).

Questo sistema è in grado di rilevare una qualsiasi variazione di sequenza negli ampliconi del gene in analisi servendosi di un programma noto come “Gene Scanning”, basato sulla metodica High Resolution Melting (HRM). L’HRM è in grado di identificare mutazioni geniche, in base alla temperatura di dissociazione dei due filamenti (T_m) e alla successiva analisi delle curve di melting (Figura 9).

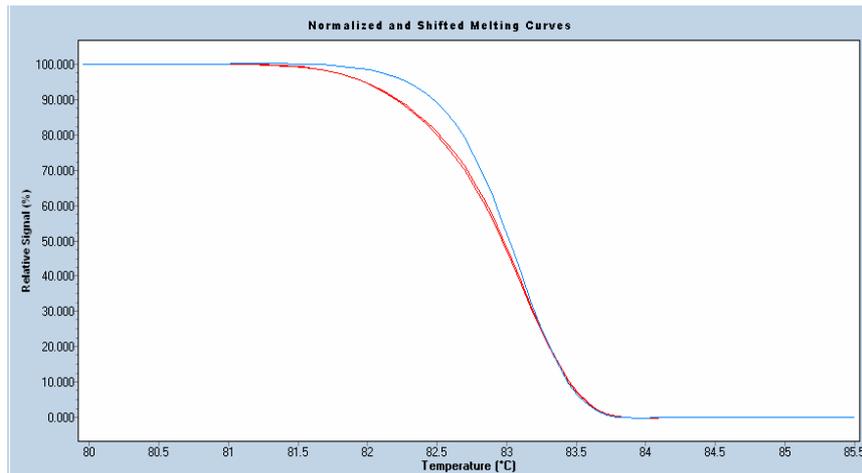


Figura 9. Curve di *melting* di un campione mutato (curva rossa) e di un controllo sano (curva blu).

L'intero processo di Real Time PCR-HRM si compone di una fase di amplificazione delle regioni di DNA in analisi e di una successiva separazione degli ampliconi indotta da un aumento di temperatura. Tramite il Gene Scanning, le curve di melting generate verranno in seguito analizzate. La metodica utilizza un SYBR green di ultima generazione, il Light Cycler® 480 High Resolution Melting DYE, in grado di legarsi ad ogni solco minore e soltanto al DNA a doppio filamento. Quindi, il cambiamento di fluorescenza viene utilizzato sia per monitorare l'incremento della concentrazione del DNA durante la Real Time PCR sia per costruire le curve di melting durante l'High Resolution Melting.

Sette coppie di primer sono state disegnate per l'analisi dei sette esoni del gene GLA e delle regioni di regolazione dello splicing fiancheggianti (Tabella 3).

	Regione	Primer
GLA	Esone 1	5'-TCTTACGTGACTGATTATTGGTCT-3'
		5'-CACACCCAAACACATGGAAA-3'
	Esone 2	5'-GTACCTAAGTGTTTCATTTAATG-3'
		5'-ACAGAAGTGCTTACAGTCCTC-3'
	Esone 3	5'-TATTCTTTGTCTTCCAACAAACTCA-3'
		5'-CTCAGCTACCATGGCCT-3'
	Esone 4	5'-GCTGGAAATTCATTTCTTTCCC-3'
		5'-GGATGGTGAGAAGTGTTG-3'
	Esone 5	5'-AATCTGTAAACTCAAGAGAAGGCTA-3'
		5'-CTTTACCTGTATTTACCTTGAATG-3'
	Esone 6	5'-AATGTTTCCTCCTCTTGTG-3'
		5'-AGTTGGTATTGGGTATATAAAG-3'
	Esone 7	5'-CTTGATAGTTCTGACATTAAGA-3'
		5'-AGAAAAGGTGGACAGGAAGT-3'
	IVS4	5'-CTTGCTTTTTTCTGCCTAG-3'
		5'-TTAACCATATGCGAGAGATACAGT-3'

Tabella 3: Sequenze delle coppie di primer usati per lo studio del gene GLA.

Le seguenti condizioni di Real-Time PCR sono state utilizzate: 5-30ng di DNA genomico è stato amplificato in un volume totale di 20µl contenente la Light Cyler 480 Master Mix con il colorante fluorescente HRM Dye (Roche Applied Science, Germany), MgCl₂ 3,5 mM, primers specifici 0.2 µM.

Il programma di amplificazione usato con lo strumento Light Cyler 480 (Roche Applied Science, Germany) è: 95°C per 10 minuti; 40 cicli a 95°C per 10 secondi, 58°C per 15 secondi e 72°C per 15 secondi (Figura 10).

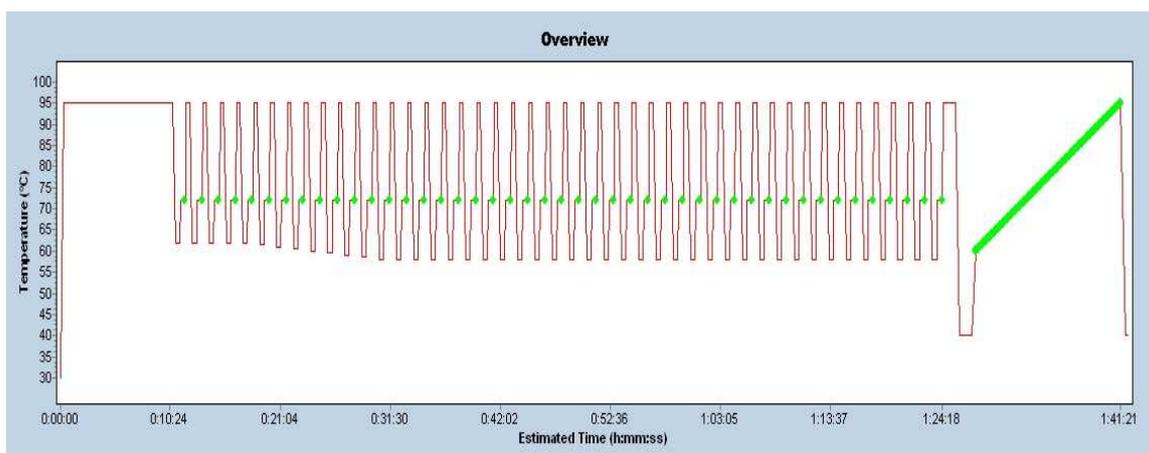


Figura 10: Programma di amplificazione in Real-Time PCR (High Resolution Melting).

Dopo l'amplificazione, i prodotti di PCR sono stati sottoposti a *melting* da 65°C a 95°C (Figure 6), e i profili risultanti sono stati analizzati con il software Gene Scanning (Roche Applied Science, Germany). Al fine di individuare con certezza gli individui emizigoti per mutazioni in GLA, i campioni di soggetti maschi vengono analizzati con l'aggiunta di un DNA *wild-type* DNA in rapporto 1:1 così da generare eterozigoti artificiali e indurre la formazione di *heteroduplex*.

I prodotti di PCR con curve di *melting* differenti in posizione o forma rispetto ai controlli *wild-type* sono stati sequenziati per identificare le mutazioni sospette (Figure 7). Pertanto, i frammenti di PCR purificati sono stati sottoposti a sequenziamento automatico presso la BMR Genomics.

Per l'analisi del gene MEFV e del gene SAA1, il DNA dei soggetti in esame è stato sottoposto ad amplificazione e successivamente sequenziato con i primer specifici (Tabella 4).

	Regione	Primer
MEFV	Esone 1	5'-CATGGACACACCCTTACCCTTAG-3'
		5'-ATCTGGATTTTGGTAGACCTGAG-3'
	Esone 2	5'-GTGGGACAGCTTCATCATT-3'
		5'-TTCTCTGCAGCCGATAT-3'
	Esoni 3-4	5'-CACATCTCAGGCAAGGGCTGTGT-3'
		5'-CCATCCCTGCTGCCCTGTGAAC-3'
	Esone 5	5'-GCATAAGCCACCTCTTATCCAC-3'
		5'-CACTTGTTCCAGCACGGCTGATG-3'
	Esoni 6-7	5'-CTTCCACTGACACCCTAGGGCAG-3'
		5'-AGGGGCTCTGGGCTATGTGGATC-3'
	Esoni 8-9-10	5'-GGTGCATGCTCACTTCCTCCCTA-3'
		5'-CCATAGCAGCTAGCACCTAGTC-3'
SAA	Esone 3	5'-GCCAATTACATCGGCTCAGAC-3'
		5'-CACCATGGCCAAAGAATCTCTGG-3'

Tabella 4 Sequenze delle coppie di primer usati per lo studio del gene MEFV e del gene SAA1.

Dried Blood Filter Paper test: saggio per l'attività di α -galattosidasi A

L'attività dell' α -galattosidasi A è stata determinata con il *Dried Blood Filter Paper test* (DBFP) descritto da Chamoles et al, ottimizzandolo ai fini diagnostici [64]. In breve, campioni in doppio di sangue intero posto su spot di carta assorbente (5.5 μ l/disco) sono stati incubati a 37°C, contro il bianco, per 1, 2 e 3 ore con 70 μ l di una miscela contenente il substrato sintetico 4-

metilumbelliferil- α -D-galattopiranoside 5mM e l'N-acetil-D-galattosammina 0.25 M, in rapporto 2.5:1 (v:v), entrambi in tampone citrato-fosfato (CPB) 0.15M pH 4.5. Al fine di rendere specifica la reazione enzimatica, abbiamo usato l'inibitore dell' α -galattosidasi A deoxygalactonojirimycin hydrochloride (DGJ) 0.6 mg/ml in CPB. Le reazioni sono state fermate in diversi tempi aggiungendo 250 μ l di etilendiammina 0.1M pH 11.4. Il 4-methylumbelliferone (4-MU) rilasciato è stato misurato con il sistema *Wallac Microtiter Fluorometer plate reader* (Perkin Elmer, USA) alle lunghezze d'onda di eccitazione di 355nm e di emissione di 460nm con una curva di calibrazione fino a 20nmol 4-MU in sale sodio. L'attività enzimatica è stata misurata in U/ml/hr (1 U = 1 nmol) di 4-MU integrando i valori risultanti delle tre reazioni *end-point*.

5. RISULTATI

L'indagine molecolare dei geni MEFV e GLA è stata eseguita su **221** pazienti con diagnosi clinica di Febbre Mediterranea Familiare. 23 pazienti (10,4%) analizzati per il gene MEFV presentavano una mutazione in omozigosi (K695R, M680I, M694V, R202Q, R761H), 16 (7,2%) erano “eterozigoti composti” (E148Q/M694; E148Q/R202Q/M694V; E148Q/K695R; E148Q/R202Q; E148Q/R408Q/M694V; M694I/R761H; M680I/M694V; M694V/M694I; M680I/V726A; P369S/R408Q; V726A/R761H), 53 pazienti (24%) erano portatori di una singola mutazione a carico del gene MEFV (A744S; E148Q; G632S; I591T; K695R; M680I; M694V; P369S; R761H; V726A), 129 non hanno presentato mutazioni nel gene MEFV (58,4%) (Tabella 5).

Genotipo di MEFV nei pazienti con sospetta diagnosi di FMF	Numero pazienti con mutazioni del gene MEFV
Omozigoti	23
Eterozigoti Composti	16
Eterozigoti	53
MEFV Wild-type	129
Totale	221

Tabella 5: Risultati analisi genetica nei pazienti con diagnosi di FMF

I pazienti omozigoti per FMF presentavano un quadro fenotipico “classico”, mentre i soggetti eterozigoti un quadro fenotipico di tipo “mild” e/o PFAPA-like caratterizzato da *febbre ricorrente, faringotonsillite essudativa, aftosi del cavo orale, linfadenopatia*.

Come ribadito precedentemente, la determinazione di una correlazione genotipo-fenotipo non è sempre agevole e, pertanto, le manifestazioni cliniche e la severità del fenotipo dipendono essenzialmente dal tipo di mutazione, se ad alta e/o a bassa penetranza, o ancora dalla presenza di una “*eterozigosi composta*”.

Anche i soggetti in cui la diagnosi clinica di FMF non è stata supportata dall’analisi genetica di MEFV presentavano alcuni sintomi della FMF quali episodi febbrili ricorrenti e dolori addominali. Nel grafico qui di seguito (Figura 11) viene riportata “*l’incidenza*” nella nostra casistica delle singole manifestazioni cliniche in base al genotipo.

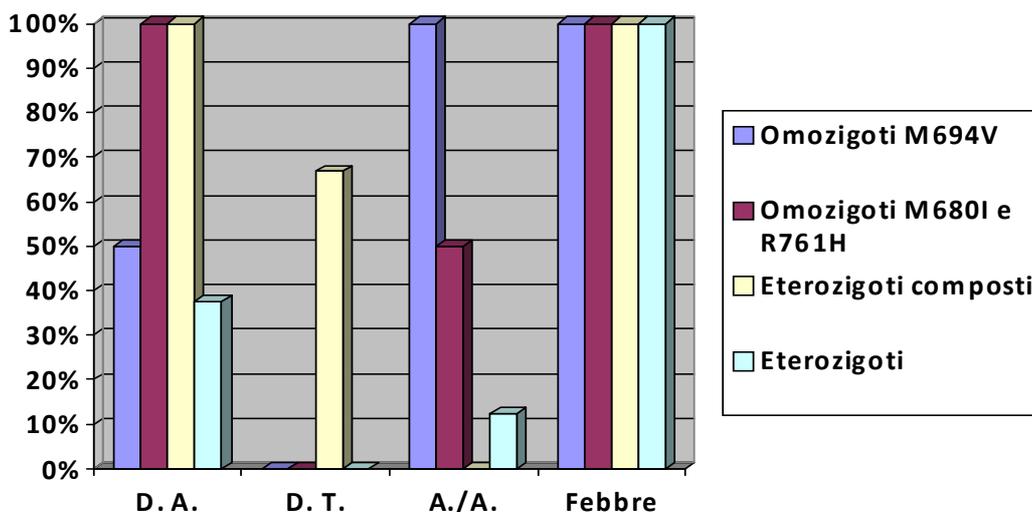


Figura 11. D.A.: dolore addominale; D.T.: dolore toracico; A./A.: artrite/artralgie; Febbre.

L'analisi del gene GLA ha consentito di documentare la presenza di mutazioni esoniche e di mutazioni esoniche + introniche a carico del gene GLA in 7/221 pazienti con sospetta diagnosi di Febbre Mediterranea Familiare e di mutazioni introniche di GLA in 71/221 soggetti (tabella 6 e 7).

Gene GLA										
	Aplotipo	Esone 1	Introne 1/ Esone 2	Introne 2/ Esone 3	Introne 3/ Esone 4	Introne 4/ Esone 5	Introne 5/ Esone 6	Introne 6/ Esone 7	Introne 4	Pazienti con mutazioni in GLA/totale
Mutazioni Esoniche + Introniche	1	-10 C>T	wt	IVS2-77_B1del5 +S126G	wt	IVS4-16 A>G	wt	IVS6-22C>T	wt	3/221
Mutazioni Esoniche + Introniche	1	-10 C>T +M51I	wt	IVS2-77_B1del5	wt	IVS4-16 A>G	wt	IVS6-22C>T	wt	2/221
Mutazioni Esoniche	-	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D313Y	wt	2/221
Totale campioni con mutazioni esoniche e introniche in GLA										7/221

Tabella 6. La tabella mostra le mutazioni delle regioni esoniche e esoniche/introniche del gene GLA e il numero di pazienti in cui sono state riscontrate, rispetto al totale.

Gene GLA									
Aplotipo	Esone 1	Introne 1/ Esone 2	Introne 2/ Esone 3	Introne 3/ Esone 4	Introne 4/ Esone 5	Introne 5/ Esone 6	Introne 6/ Esone 7	Introne 4	Pazienti con mutazioni in GLA/totale
1	-10 C>T	wt	IVS2- 77_81del5	wt	IVS4-16 A>G	wt	IVS6-22C>T	wt	27/221
2	wt	wt	IVS2- 77_81del5	wt	IVS4-16 A>G	wt	IVS6-22C>T	wt	17/221
3	-12G>A	wt	wt	wt	IVS4+68 A>G	wt	IVS6-22C>T	wt	9/221
4	-12G>A	wt	wt	wt	IVS4+68 A>G;	wt	IVS6-22C>T	IVS4+866_867 delAG	10/221
5	wt	wt	wt	wt	wt	wt	IVS6-22C>T	wt	1/221
9	-30G>A	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	2/221
11	-10	wt	wt	wt	wt	wt	IVS6-22C>T	IVS4+739 C>T (g.9151 C>T)	2/221
14	wt	wt	wt	wt	IVS4-16 A>G	wt	IVS6-22C>T	wt	2/221
3+4	-12 G>A omozigote	wt	wt	wt	IVS4+68 A>G omozigote	wt	IVS6-22C>T omozigote	IVS4+866_867 delAG	1/221
Totale campioni con mutazioni introniche in GLA									71/221

Tabella 7. La tabella mostra le mutazioni delle regioni introniche del gene GLA e il numero di pazienti in cui sono state riscontrate, rispetto al totale.

I soggetti in cui sono state evidenziate le mutazioni esoniche erano stati sottoposti ad analisi genetica del gene MEFV, il cui risultato era una sola mutazione in eterozigosi, che non giustificava il quadro clinico di tali pazienti.

L'analisi dell'attività enzimatica ha mostrato che i pazienti con mutazioni esoniche nel gene GLA riportavano valori di attività enzimatica al di sotto del range normale (i valori normali dell'attività dell'enzima nel sangue intero sono >3 nmol/ml/h).

Una approfondita indagine clinica ha evidenziato che i soggetti con mutazioni nel gene GLA mostravano alcuni segni

clinici, quali disfunzioni cardiache e coesistenza di diversi sintomi, più suggestivi della Fabry rispetto ai pazienti senza mutazioni in GLA.

I 23 i pazienti omozigoti per il gene MEFV mostravano un quadro fenotipico classico di FMF caratterizzato da febbre ricorrente, artralgie, dolori addominali, mialgie, manifestazioni gastrointestinali e faticabilità. Tra essi, i soggetti con mutazioni anche a carico del gene GLA rispetto ai soggetti in cui non ne sono state riscontrate, pur rispondendo discretamente alla colchicina, hanno mantenuto valori di SAA >50 mg/dl.

I pazienti eterozigoti composti per il gene MEFV in cui sono state riscontrate mutazioni introniche in GLA presentavano, oltre ad un quadro clinico PFAPA-like, ischemie cerebrali multiple, segni iniziali di compromissione renale (*proteinuria*) e riduzione della soglia uditiva.

Clinicamente non sono state riscontrate notevoli differenze tra i soggetti portatori di una mutazione a carico del gene MEFV e quelli in cui sono state individuate anche mutazioni in GLA. Mediamente, questi soggetti, a parte alcuni sintomi presuntivi di FMF (febbre e dolori addominali) non mostravano un quadro caratteristico di Febbre Mediterranea Familiare. Alcuni soggetti

infatti (con e senza mutazioni anche in GLA) presentavano altri segni non peculiari della FMF quali angiocheratomi, manifestazioni gastrointestinali, faticabilità, aritmie cardiache, difetti di conduzione, dispnea e mal di testa ricorrenti.

Sia i pazienti che presentavano mutazioni introniche in GLA e MEFV *wild-type* che i soggetti in cui l'indagine è risultata negativa in entrambi i geni, a parte alcuni sintomi suggestivi della FMF (febbre e dolori addominali) presentavano altri segni e sintomi sistemici.

Tutti i pazienti con mutazioni in regioni introniche di GLA hanno riportato valori di attività dell'enzima α -galattosidasi A all'interno del range normale (i valori normali dell'attività dell'enzima nel sangue intero sono >3 nmol/ml/h).

Tutti i soggetti presenti nello studio sono stati sottoposti all'analisi genetica dei polimorfismi del gene di SAA1, con lo scopo di valutare se il genotipo α , correlato, secondo diversi studi, a una maggiore suscettibilità a sviluppare amiloidosi, contribuisca a determinare il fenotipo clinico.

Nelle tabelle viene riportata la distribuzione e la percentuale dei genotipi possibili in tutte le condizioni che ci siamo ritrovati ad analizzare:

Genotipo SAA1	Numero pazienti con sospetta FMF	%
α/α	51/221	23
α/β	104/221	47
β/β (wild-type)	53/221	24
β/γ	4/221	2
α/γ	9/221	4

Tabella 8. Distribuzione e percentuale dei genotipi di SAA1 su tutti i soggetti analizzati.

Genotipo SAA1	Numero pazienti con GLA e MEFV wild-type	%
α/α	20/87	23
α/β	40/87	46
β/β (wild-type)	22/87	25
β/γ	1/87	1
α/γ	4/87	5

Tabella 9. Distribuzione e percentuale dei genotipi di SAA1 nei pazienti privi di mutazioni sia nel gene GLA che nel gene MEFV.

Genotipo SAA1	Numero pazienti con GLA wt e MEFV mutato	%
α/α	15/56	27
α/β	29/56	52
β/β (wild-type)	11/56	19
β/γ	1/56	2
α/γ	0/56	0

Tabella 10. Distribuzione e percentuale dei genotipi di SAA1 nei pazienti privi di mutazioni nel gene GLA e con mutazioni solo nel gene MEFV.

Genotipo SAA1	Numero pazienti con GLA mutato e MEFV wild-type	%
α/α	9/42	21,4
α/β	19/42	45
β/β (wild-type)	11/42	26
β/γ	1/42	2,6
α/γ	2/42	5

Tabella 11. Distribuzione e percentuale dei genotipi di SAA1 nei pazienti con mutazioni solo nel gene GLA e privi di mutazioni nel gene MEFV.

Genotipo SAA1	Numero pazienti con GLA mutato e MEFV mutato	%
α/α	9/36	25
α/β	15/36	41,6
β/β (wild-type)	8/36	22,7
β/γ	1/36	2,7
α/γ	3/36	8

Tabella 12. Distribuzione e percentuale dei genotipi di SAA1 nei pazienti con mutazioni sia nel gene GLA e sia nel gene MEFV.

Dalla osservazione di questi dati è evidente come la distribuzione dei vari genotipi di SAA1 risulti costante nelle varie categorie di soggetti studiati.

Solo nel caso di soggetti con il gene GLA wild-type e con mutazioni nel gene MEFV, in particolare quando tali mutazioni ricadono nell'esone 10 del gene (M680I, M694I, M694V, V726A), la percentuale in cui si presenta il genotipo α aumenta così come ci

si aspettava, vista l'azione di gene modificatore di SAA1 nei confronti di MEFV.

Al fine di comprendere se i risultati ottenuti dipendessero dalla scelta di casi selezionati, con un fenotipo clinico definito e con un sospetto clinico preciso, l'analisi è stata svolta su 170 soggetti controllo sani (Tabella 13).

Genotipo SAA1	Numero soggetti controllo	%
α/α	56/170	33
α/β	80/170	47
β/β (wild-type)	20/170	12
β/γ	8/170	4,5
α/γ	6/170	3,5

Tabella 12. Distribuzione e percentuale dei genotipi di SAA1 nei soggetti controllo sani.

I risultati dell'analisi condotta sui soggetti controllo confermano che la distribuzione dei genotipi di SAA1 osservata nei pazienti sopra descritti è reale e che la correlazione tra il fenotipo clinico di tali pazienti e il genotipo di SAA1 è casuale.

6. DISCUSSIONE

La malattia di Fabry è una patologia lisosomiale in cui il metabolismo glicosfingolipidico è fortemente compromesso. Il deficit dell' α -galattosidasi A conduce al progressivo accumulo principalmente di globotriasilceramide nelle cellule parenchimali di diversi organi e nelle cellule endoteliali. E' una patologia considerata rara ma in realtà, come risulta dalla recente letteratura, sarebbe più giusto considerarla un disordine non comune, poco conosciuto. La diagnosi risulta ad oggi ancora difficile proprio per le peculiarità della malattia, che si presenta con manifestazioni cliniche sovrapponibili a quelle di altre patologie ed un'ampia possibilità di diagnosi differenziali che coinvolgono diverse specializzazioni mediche. Soprattutto i soggetti affetti dalle forme atipiche risultano più difficili da diagnosticare rispetto a quelli che manifestano un fenotipo classico.

Il lavoro che ho svolto per questo progetto di ricerca mi ha consentito di constatare e di confermare come in assenza di un quadro clinico sistemico severo di Malattia di Fabry, la sovrapposizione dei quadri clinici di FD e di FMF possa determinare errori nella diagnosi, come osservato nei diversi casi descritti.

L'identificazione delle mutazioni esoniche del gene GLA sopra descritte associate a malattia di Fabry in pazienti in cui la diagnosi presuntiva è stata di FMF, induce a considerare valida l'ipotesi del nostro studio.

Quindi, alcuni sintomi clinici della FD (febbre ricorrente, malattia da accumulo renale e dolori addominali) possono essere confusi con quelli di FMF, determinando un errore nella diagnosi di Febbre Mediterranea Familiare e di conseguenza una sottostima della malattia di Fabry. Per questo motivo, una attenta analisi genetica del gene GLA e del gene MEFV nonché una corretta anamnesi familiare dovrebbe essere fatta sui soggetti che presentano quadri sintomatologici sovrapponibili alle due malattie.

I dati riportati dal nostro studio, ottenuti da una casistica selezionata di pazienti, possono essere considerati significativi specie se paragonati a quella che è l'incidenza della Malattia di Fabry nella popolazione generale.

Il secondo obiettivo del mio progetto di ricerca è stato quello di confermare che il gene SAA1 (siero amiloide A) sia un *modifier gene* della Febbre Mediterranea Familiare e di comprendere se le sue caratteristiche genotipiche potessero avere

effetti sul fenotipo di pazienti con mutazioni anche a carico del gene GLA.

La scelta di studiare il gene SAA1 e il gene GLA in pazienti con Febbre Mediterranea Familiare deriva dal fatto che il 24% dei pazienti con sintomi riconducibili alla FMF da noi studiati sono portatori di una singola mutazione nel gene MEFV che comunque da solo non sarebbe responsabile della FMF. Il SAA1 è uno dei pochi esempi di gene modificatore nell'uomo.

Per quanto riguarda i nostri risultati, l'analisi clinica dei soggetti portatori di mutazioni in omozigosi e in eterozigosi composta per il gene MEFV e con mutazioni anche in GLA, ha mostrato alcune differenze rispetto ai soggetti con mutazioni soltanto nel gene responsabile della FMF, che risiedono negli indici di flogosi elevati e nella presenza di altri sintomi non peculiari della FMF quali le ischemie cerebrali multiple, segni iniziali di compromissione renale (*proteinuria*) oltre ad una riduzione della soglia uditiva.

Per cui, dati i risultati clinici e genetici è possibile avanzare l'ipotesi secondo cui in soggetti omozigoti e/o eterozigoti composti per il gene MEFV, la presenza di una mutazione a carico del gene GLA, può *complicare* il fenotipo clinico.

Sebbene i nostri dati confermino la correlazione esistente tra SAA1 e mutazioni in omozigosi o in eterozigosi composta nel gene MEFV - soprattutto quando esse ricadono nell'esone 10 -, lo stesso non può essere confermato nel caso di GLA e SAA1, il cui genotipo correlato a suscettibilità all'amiloidosi non influenzerebbe il fenotipo clinico di pazienti con mutazioni a carico del gene GLA.

In conclusione:

1) Una attenta analisi genetica del gene GLA e del gene MEFV nonché una corretta anamnesi familiare dovrebbe essere fatta sui soggetti che presentano quadri sintomatologici sovrapponibili alle due malattie;

2) In soggetti portatori di mutazioni nel gene MEFV con fenotipo compatibile con la diagnosi di FMF, la presenza polimorfismi del gene SAA1 avvalorata l'ipotesi dei "geni modificatori", secondo la quale particolari gruppi di geni modificano l'espressione di un carattere semplice, che di solito dipende da una coppia di alleli;

3) in soggetti portatori di una mutazione singola del gene MEFV con un fenotipo incompleto e in quelli la cui genetica di

MEFV non giustifica la diagnosi di FMF, il riscontro di mutazioni introniche e/o esoniche del gene GLA, potrebbe avvalorare la diagnosi di un'altra patologia sistemica.

I risultati ottenuti per quanto riguarda l'interazione fra i geni MEFV, GLA e SAA1 sono preliminari. Intendiamo quindi, estendere lo studio ad una casistica più ampia e più selettiva.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] Hull KM, Shoham N, Chae JJ, Aksentijevich, Kastner DL. **Autoinflammatory syndromes behind the scenes of recurrent fevers in children.** *Med Sci Monit*, 2009; 15(8): RA179-187.

[2] Stehlik C, Reed JC. **The PYRIN connection: novel players in innate immunity and inflammation.** *J Exp Med*. 2004;200(5):551-8.

[3] Dinarello CA et al. **Autoinflammation: The prominent role of IL-1 in monogenic autoinflammatory diseases and implications for common illnesses.** *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1141-9.

[4] Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, Park G, Smith BJ, Kastner DL. **The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(26):9982-7

[5] Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, Kingma DW, Horwitz ME, Mansfield E, Holland SM, O'Shea JJ, Rosenberg HF, Malech HL, Kastner DL. **The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators.** *Blood*. 2000 May 15;95(10):3223-31.

[6] Touitou I, Notarnicola C, Didelot MN, Kone-Paut I, et al. **Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever.** *Arthritis Rheum* 2003;46:2785-93.

[7] Martinon F, Tschopp J. **Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation.** *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):10-22.

[8] Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. **NALP3 forms an IL-1beta processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder.** *Immunity* 2004;20:319-25.

[9] Papin S, Cuenin S, Agostini L, Martinon F, Werner S, Beer HD, Grütter C, Grütter M, Tschopp J. **The SPRY domain of Pyrin,**

mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing. *Cell Death Differ.* 2007 Aug;14(8):1457-66.

[10] Ozen S. **Familial mediterranean fever: revisiting an ancient disease.** *Eur J Pediatr.* 2003; 162(7-8) 449-54.

[11] Ben-Chetrit E, Touitou I. **Familial Mediterranean Fever in the World.** *Arthritis Rheum* 2009; 61(10) 1447-53.

[12] Toplak N. et al. **An international registry on autoinflammatory disease: the Eurofever experience.** *Ann. Rheum.* 2012 Dis. 71, 1177–1182.

[13] Ozen, S. et al. **Results from a multicentre international registry of Familial Mediterranean Fever: impact of environment on the expression of a monogenic disease in children.** *Ann. Rheum. Dis.* doi:10.1136/annrheumdis-2012-202708.

[14] Migita, K. et al. **Familial Mediterranean fever in Japan.** *Medicine* 2012 91, 337–343.

[15] Lidar M., Livneh A. **Familial Mediterranean fever: clinical, molecular and management advancements.** *Neth J Med.* 2007 Oct;65(9):318-24.

[16] Padeh S, Livneh A, Pras E, Shinar Y, Lidar M, Feld O, Berkun Y. **Familial Mediterranean Fever in the first two years of life: a unique phenotype of disease in evolution.** *J Pediatr.* 2010 Jun;156(6):985-9.

[17] Eifan AO, Ozdemir C, Aydogan M, Gocmen I, Bahceciler NN, Barlan IB. **Incomplete attack and protracted sacroiliitis: an unusual manifestation of FMF in a child.** *Eur J Pediatr.* 2007 Apr; 166(4):383-4.

[18] Markel G, Imazio M, Brucato A, Adler Y. **Colchicine for the prevention of recurrent pericarditis.** *Isr Med Assoc J.* 2008;10(1):69-72.

[19] Barzilai A, Langevitz P, Goldberg I, Kopolovic J, Livneh A, Pras M, et al. **Erysipelas-like erythema of familial Mediterranean fever: clinicopathologic correlation.** *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:791-5.

[20] Touitou I. **The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations.** *European Journal of Human Genetics* (2001) 9, 473 ± 483.

[21] Ozen S, **Changing Concepts in Familial Mediterranean Fever: Is It Possible to Have an Autosomal-Recessive Disease With Only One Mutation?** *Arthritis Rheum.* 2009; 60(6):1575-7.

[22] Federici et al. **Validation of the newly developed pediatric criteria for the diagnosis of Familial Mediterranean fever in a large pediatric cohort of western European children with periodic fever.** 2011. Article in Pres.

[23] Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, et al. **Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever.** *Am J Hum Genet.* 2000 Nov;67(5):1136-43.

[24] Grateau G. **The relation between familial Mediterranean fever and amyloidosis.** *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:61-4

[25] Obici L, Merlini G. **Amyloidosis in autoinflammatory syndromes.** *Autoimmun Rev* 2012; 12:14-7.

[26] Medlej-Hashim M, Delague V, Chouery E, Salem N, Rawashdeh M, Lefranc G et al. **Amyloidosis in familial Mediterranean fever patients: correlation with MEFV genotype and SAA1 and MICA polymorphisms effects.** *BMC Med Genet* 2004;5:4.

[27] Pras M. **Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene.** *Scand J Rheumatol* 1998; 27: 92-7

[28] Yalçinkaya F, Ozen S, Ozçakar ZB, Aktay N, Cakar N, Düzova A, Kasapçopur O, Elhan AH, Doganay B, Ekim M, Kara N, Uncu N, Bakkaloglu A. **A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood.** *Rheumatology (Oxford).* 2009 Apr; 48(4):395-8.

[29] Medlej-Hashim M, Loiselet J, Lefranc G, Mégarbané A. **Familial Mediterranean Fever (FMF): from diagnosis to treatment.** *Sante.* 2004; 14(4) 261-6.

- [30] Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, Kingma DW, Horwitz ME, Mansfield E, Holland SM, O'Shea JJ, Rosenberg HF, Malech HL, Kastner DL. **The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators.** *Blood.* 2000; 95(10):3223-31.
- [31] Dinarello CA, Wolff SM, Goldfinger SE, Dale DC, Alling DW. **Colchicine therapy for familial mediterranean fever. A double-blind trial.** *N Engl J Med* 1974; 291: 934-7.
- [32] Ozturk MA, Kanbay M, Kasapoglu B, Onat AM, Guz G, Furst DE, et al. **Therapeutic approach to familial Mediterranean fever: a review update.** *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29: S77-86
- [33] Calligaris L, Marchetti F Tommasini A, Ventura A, **The efficacy of anakinra in an adolescent with colchicine-resistant familial Mediterranean fever,** *Eur J Pediatr* (2008) 167:695–696.
- [34] Helen J. Lachmann et Al. **Use of Canakinumab in the Cryopyrin - Associated Periodic Syndrome.** *N Engl J Med* 2009; 360:2416-25.
- [35] Kornreich, R., Bishop, D. F., Desnick, R. J. **The gene encoding alpha-galactosidase A and gene rearrangements causing Fabry disease.** *Trans. Assoc. Am. Phys* 1989. 102: 30-43.
- [36] Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. **Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency.** *N Engl J Med.* 1967 May 25;276(21):1163-7.
- [37] Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. **Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease.** In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.* p. 3733–74.
- [38] Dominique P Germain. **Fabry disease.** *Germain Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:30.
- [39] Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukul T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ. **High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening.** *Am J Hum Genet.* 2006; 79(1) 31-40.
- [40] Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolsky R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW:

Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat* 2009, 30(10):1397-405.

[41] Lin HY, Chong KW, Hsu JH, Yu HC, Shih CC, Huang CH, Lin SJ, Chen CH, Chiang CC, Ho HJ, Lee PC, Kao CH, Cheng KH, Hsueh C, Niu DM: **High Incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population.** *Circ Cardiovasc Genet* 2009, 2:450-456.

[42] Hoffmann B, Mayatepek E. **Fabry disease, often seen rarely diagnosed.** *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(26): 440–7.

[43] Germain DP: **A new phenotype of Fabry disease with intermediate severity between the classical form and the cardiac variant.** *Contrib Nephrol* 2001, 136:234-240.

[44] Valbuena C, Carvalho E, Bustorff M, Ganhao M, Relvas S, Nogueira R, Carneiro F, Oliveira JP. **Kidney biopsy findings in heterozygous Fabry disease females with early nephropathy.** *Virchows Arch* 2008; 453:329-338.

[45] Pinto LL, Vieira TA, Giugliani R, Schwartz IV. **Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review.** *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:14.

[46] Lyon MF: **Gene action in the X-chromosome of the mouse (mus musculus L.).** *Nature* 1961, 190:372-373.

[46] Martins AM. **Guidelines to diagnosis and management of Fabry disease and review of treatment Experiences.** *The Journal of Pediatrics* 2009.

[47] Davies JP, Winchester BG, Malcolm S. **Sequence variations in the first exon of alpha-galactosidase A.** *J Med Genet.* 199;3 30(8) 658-63.

[48] Altarescu GM, Goldfarb LG, Park KY, Kaneski C, Jeffries N, Litvak S, Nagle JW, Schiffmann R. **Identification of fifteen novel mutations and genotype–phenotype relationship in Fabry disease.** *Clin Genet* 2001 60 46–51.

- [49] Ishii S, Nakao S, Minamikawa-Tachino R, Desnick RJ, Fan JQ. **Alternative splicing in the alpha-galactosidase gene: increased exon inclusion results in the Fabry cardiac phenotype.** *Am J Hum Genet.* 2002 70 994-1002.
- [50] Tsukimura T, Chiba Y, Ohno K, Saito S, Tajima Y, Sakuraba H. **Molecular mechanism for stabilization of a mutant α -galactosidase A involving M51I amino acid substitution by imino sugars.** *Mol Genet Metab.* 2011 103(1) 26-32.
- [51] Garman SC, Garboczi DN. **The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase.** *J Mol Biol.* 2004 19;337(2) 319-35.
- [52] Auray-Blais C, Ntwari A, Clarke JT, Warnock DG, Oliveira JP, Young SP, Millington DS, Bichet DG, Sirrs S, West ML, Casey R, Hwu WL, Keutzer JM, Zhang XK, Gagnon R. **How well does urinary lyso-Gb3 function as a biomarker in Fabry disease?** *Clin Chim Acta.* 2010; 411(23-24):1906-14
- [53] Schiffman R, **Fabry disease.** *Pharmacol Ther.* 2009 122(1) 65-7.
- [54] Omid Motabar, Ellen Sidransky, Ehud Goldin and Wei Zheng. **Fabry Disease – Current Treatment and New Drug Development,** *Current Chemical Genomics,* 2010, 4, 50-56.
- [55] Dinc A, Simsek I, Pay S, Caglar K, Can C. **Fabry's disease mimicking familial Mediterranean fever.** *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18(6):787-8.
- [56] Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soyuturk M, et al. **The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever.** *Qjm.* 2000; 93(4):217–221.
- [57] Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, Dervichian M, Nedelec B, Reinert P, et al. **MEFV-Gene analysis in armenian patients with Familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications.** *Am J Hum Genet.* 1999; 65(1):88–97.
- [58] Booty MG, Chae JJ, Masters SL, Remmers EF, Barham B, Le JM, Barron KS, Holland SM, Kastner DL, Aksentijevich I. **Familial**

Mediterranean fever with a single MEFV mutation: where is the second hit? *Arthritis Rheum.* 2009 Jun; 60(6):1851-61.

[59] Oliveira JP, Ferreira S, Reguenga C, Carvalho F, Mansson JE. **The g.1170C>T polymorphism of the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase gene is associated with decreased enzyme expression—Evidence from a family study.** *J Inherit Metab Dis* 2008; 31(2):405-13.

[60] Oliveira JP, Ferreira S, Barceló J, Gaspar P, Carvalho F, Sá Miranda MC, Månsson JE. **Effect of single-nucleotide polymorphisms of the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase gene on enzyme activity, and their frequencies in Portuguese Caucasians.** *J Inherit Metab Dis* 2008; 31(2):247-53.

[61] Rodríguez-Marí A, Coll MJ, and Chabás A. **Molecular Analysis in Fabry Disease in Spain: Fifteen Novel GLA Mutations and Identification of a Homozygous Female.** *Hum Mutat* 2003; 22(3):258.

[62] Takata T, Okumiya T, Hayashibe H, Shimmoto M, Kase R, Itoh K, Utsumi K, Kamei S, Sakuraba H. **Screening and detection of gene mutations in Japanese patients with Fabry disease by non-radioactive single-stranded conformation polymorphism analysis.** *Brain & Development* 1997; 19(2):111-6.

[63] Tanislav C, Kaps M, Rolfs A, Böttcher T, Lackner K, Paschke E, Mascher H, Laue M, Blaes F. **Frequency of Fabry disease in patients with small-fibre neuropathy of unknown aetiology: a pilot study.** *Eur J Neurol* 2011; 18(4):631-6.

[64] Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. **Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper.** *Clin Chim Acta* 2001;308(1-2):195-6.