

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze mediche generali e dei servizi

Ciclo 29

Settore Concorsuale di afferenza: Area 06 - Scienze mediche > 06/G - Clinica pediatrica > 06/G1 Pediatria generale, specialistica e neuropsichiatria infantile

Settore Scientifico disciplinare: Area 06 - Scienze mediche > MED/38 Pediatria generale e specialistica

TITOLO TESI

Presentata da: Bertelli Luca

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Luigi Bolondi

Prof. Andrea Pession

Esame finale anno 2017

Sommario	
INDICE	2
1 CAPITOLO Introduzione generale.....	3
<i>1.1 Introduzione.....</i>	4
2 CAPITOLO Parte sperimentale	8
<i>2.1 INTRODUZIONE E SCOPO</i>	9
<i>2.2 PAZIENTI E METODI.....</i>	10
<i>Disegno dello studio</i>	10
<i>Popolazione in studio</i>	11
<i>Polisonnografia.....</i>	12
<i>Indagini sui tessuti in vitro</i>	20
<i>Visite e valutazioni.....</i>	22
<i>2.3 RISULTATI.....</i>	23
<i>Popolazione studiata.....</i>	23
<i>Analisi di espressione genica.....</i>	23
<i>Analisi dei pathways cellulari.....</i>	23
3 CAPITOLO Analisi critica dei risultati.....	25
<i>3.1 DISCUSSIONE.....</i>	26
<i>3.2 CONCLUSIONI.....</i>	33
<i>3.3 TABELLE E GRAFICI.....</i>	34
3 BIBLIOGRAFIA.....	42

Capitolo 1

Introduzione generale

INTRODUZIONE

La taskforce dell'European Respiratory Society (ERS) sulla diagnosi e la gestione dei disturbi respiratori del sonno nell'infanzia ha definito il disturbo ostruttivo respiratori nel sonno come una sindrome disfunzionale delle alte vie aeree durante il sonno, caratterizzato da russamento e/o aumentato lavoro respiratorio secondario ad aumentata resistenza delle alte vie aeree e collassabilità del faringe [1]. Tutto ciò può esitare in ipossia, ipercapnia, aumento del lavoro respiratorio, aumento della pressione intratoracica e frammentazione del sonno. Lo spettro clinico dei disturbi respiratori nel sonno in età pediatrica in ordine crescente di gravità comprende:

(1) Russamento primario, la manifestazione prevalente, che è definite come russamento abituale per più di tre notti per settimana senza apnee, ipopnea, frequenti arousal o alterazione degli scambi gassosi. La prevalenza di questa condizione nella popolazione è di 7.45% [2-4].

(2) Sindrome della resistenza delle alte vie aeree (UARS) è caratterizzata da russamento, aumento del lavoro respiratorio e frequenti arousal, senza eventi ostruttivi riconoscibili o anormalità degli scambi gassosi

(3) Ipoventilazione ostruttiva è caratterizzata da russamento associate ad aumento della pCO₂ in assenza di eventi ostruttivi riconoscibili

(4) Sindrome delle apnee ostruttive nel sonno (OSAS) che si manifesta con ricorrenti episodi di parziale o completa ostruzione delle alte vie aeree con desaturazioni ed alterazioni della ventilazione

e del sonno. La prevalenza di questa condizione nella popolazione è riportata tra 1% e 5% [4-5].

OSAS è un comune problema di sanità pubblica e i bambini che possono risultare a rischio di sviluppare tale condizione devono essere identificati, studiati e trattati precocemente in quanto studi sia sugli adulti che su modelli animali hanno evidenziato come l'ipossia intermitte e/o la frammentazione del sonno esitano nell'attivazione di pathways che inducono comorbidità cardiovascolari, neurocognitive e metaboliche. Tali conseguenze sistemiche interessano non solo l'età pediatrica ma possono perdurare anche nelle successive età. Sebbene le eziologie delle OSAS in età pediatrica siano multiple, possono essere classificate in condizioni che esitano in un'intrinseca riduzione di calibro delle alte vie aeree e che determina un'aumentata tendenza al collasso delle stesse. L'ipertrofia adenotonsillare è l'esempio più comune di queste condizioni. Studi radiologici basati sull'utilizzo della tecnica di risonanza magnetica hanno dimostrato che il calibro delle adenoidi e delle tonsille in bambini con OSAS risulti significativamente aumentato rispetto ai controlli sani [6]. Le cause dell'ipertrofia del tessuto linfoide in questa sede non sono ancora del tutto comprese. Altre condizioni che favoriscono la comparsa di OSAS sono la micrognazia, la macroglossia, l'ipoplasia del massiccio facciale, caratteristiche che risultano essere espressioni fenotiche di diverse sindromi (Treacher Collins syndrome, Crouzon syndrome, Apert syndrome, Pierre Robin sequence), achondroplasia, trisomia 21, Beckwith Wiedemann syndrome, and mucopolisaccaridosi. L'aumento della tendenza al

collasso delle alte vie aeree può essere causata sia da condizioni caratterizzata da un diminuito tono muscolare nella alte vie aeree, come la paralisi cerebrale, disturbi neuromuscolari, che da condizioni infiammatorie che affliggono le alte vie aeree come la rinite allergica o l'asma. Sebbene l'obesità sia un fattore di rischio meno importante che nell'adulto, i disturbi respiratori nel sonno e le OSAS risultano essere 2-3 volte più frequenti nei pazienti obesi rispetto ai controlli sani [7]. Dal punto di vista clinico OSAS è caratterizzata in età pediatrica da russamento notturno abituale, inteso come presente per più di tre notti alla settimana; associato ad altri segni e sintomi sia diurni che notturni quali la respirazione orale persistente, le difficoltà all'addormentamento e l'assunzione di posizioni atipiche durante il sonno allo scopo di ridurre l'ostruzione percepita a livello delle vie aeree superiori. Durante le ore diurne i piccoli pazienti affetti da OSAS sono spesso iperattivi, irritabili; possono presentare disturbi neurocomportamentali in grado di influire negativamente sul rendimento scolastico e sulle capacità relazionali. OSAS sono inoltre associate a ritardo di crescita, ipertensione, disturbi cardiaci. Le possibili alterazioni della crescita non sono state ancora del tutto spiegate, tuttavia è opinione diffusa che possano essere determinate da difficoltà di alimentazione secondaria all'ipertrofia adenotonsillare, aumento dell'attività metabolica per lo sforzo respiratorio durante il sonno, e da un'alterazione della regolazione ormonale con riduzione della secrezione notturna dell'ormone della crescita e del fattore di crescita insulino-simile. Una percentuale variabile tra il 13 e il 20% della popolazione con OSAS presenta sonnolenza diurna, associata a

ad agitazione diurna e iperattività e disattenzione, sintomi che mimano una sindrome da ADHD, presente in comorbidity in circa il 30% dei bambini affetti da OSAS severa. Le complicanze cardiovascolari hanno un impatto sia immediato sulla salute del bambino sia sulla prognosi a distanza: sono numerosi gli studi che hanno riportato nei bambini con OSAS un aumento della pressione arteriosa, ipertensione polmonare con cuore polmonare, ipertrofia del ventricolo sinistro con conseguente disfunzione ventricolare, aritmie, aterosclerosi, malattia coronarica precoce, in associazione a un aumento della risposta rapida all'insulina, dislipidemia, e disfunzione endoteliale, con aumento del rischio cardiovascolare. Pochi studi hanno studiato il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo ed hanno evidenziato un aumento della pressione diastolica sia in veglia che in sonno e un aumento dell'attività del sistema nervoso simpatico. La diagnosi di OSAS in età pediatrica si basa sulla valutazione dei dati clinico-anamnestici e sull'esecuzione di esami strumentali tra i quali il gold-standard è la polisomnografia, permettendo una valutazione oggettiva e quantitativa dei disturbi ventilatori e delle alterazioni del sonno. L'adenotonsillectomia (AT) come trattamento primario delle OSAS in età pediatrica, essendo l'ipertrofia adenotonsillare il principale fattore patogenetico associato alla comparsa di OSAS in età pediatrica. In questo scenario è importante investigare bambini con OSAS per valutare se il quadro clinico e le sequele a lungo termine del disturbo possano essere correlate alla diversa espressione di specifici geni con conseguente attivazione di diverse vie infiammatorie e metaboliche.

Capitolo 2

Parte sperimentale

INTRODUZIONE e SCOPO

Gli obiettivi dello studio sono esaminare i cambiamenti globali nei profili di espressione genica nei bambini con OSAS e di individuare la signature genetica che caratterizza i pazienti con OSAS. Il raggiungimento di questi obiettivi permetterà di comprendere maggiormente la pato-fisiologia del disturbo e delle sue sequele.

L'obiettivo primario dello studio:

- Verificare i cambiamenti quantitativi e qualitativi dei profili di espressione genica in bambini con OSAS
- Valutazione i cambiamenti dell'attivazione dei pathways cellulari in bambini con OSAS

PAZIENTI E METODI

Disegno dello studio

Si tratta di uno studio monocentrico esplorativo sui tessuti umani in vitro rappresentati da sangue venoso periferico (4 ml). Lo studio prevede il confronto di due gruppi di pazienti afferenti alla Pneumologia Pediatrica dell' Unità Operativa di Pediatria Specialistica del Dipartimento Attività integrata per la salute della donna, del bambino e dell'adolescente Azienda Ospedaliero – Universitaria di Bologna Policlinico Sant'Orsola – Malpighi diretta da Prof. A. Pession.

La suddivisione nei due gruppi di pazienti avverrà dopo somministrazione di Sleep clinical score (SCS), questionario che European Respiratory Society (ERS) ritiene strumento efficace di screening per i disturbi respiratori nel sonno.

- Gruppo A: pazienti con SCS positivo per OSAS ($SCS \geq 6,25$), che proseguiranno l'iter diagnostico-terapeutico con l'esecuzione di PSG in regime di ricovero presso il Reparto di Pediatria Specialistica-UO pediatria Pession,

- Gruppo B (controlli) pazienti con SCS negativo per OSAS ($SCS < 6,25$)

Lo studio prevede la valutazione a livello di ogni singolo paziente di campioni ematici.

Popolazione dello studio

I pazienti del gruppo A e del gruppo B saranno arruolati in maniera progressiva.

Criteri di inclusione (gruppo A)

Sono eleggibili allo studio i pazienti che soddisfano tutti i seguenti criteri:

- SCS positivo per OSAS
- età 3-18 anni
- consenso informato scritto

Criteri di inclusione (gruppo B)-controlli

Sono eleggibili allo studio i pazienti che soddisfano tutti i seguenti criteri:

- SCS negativo per OSAS
- età 3-18 anni
- consenso informato scritto

Criteri di esclusione gruppo A e gruppo B

Non sono eleggibili allo studio i pazienti che presentano almeno uno dei seguenti criteri:

- patologie croniche
- pazienti obesi
- terapie farmacologiche in corso
- sindromi o anomalie cranio-facciali
- infezioni nelle 8 settimane precedenti

Criteri di esclusione (solo gruppo B)

- Pazienti candidati ad AT nell'ambito del normale percorso assistenziale

Polisonnografia

Lo studio gold standard per diagnosticare i disturbi respiratori nel sonno in età pediatrica è la polisonnografia [8]. I casi popolazione oggetto di studio sono stati pertanto sottoposti a tale esame presso il Reparto di Pediatria Specialistica dell'UO-Pediatria.

La polisonnografia consiste nella registrazione contemporanea e in continuo durante la notte di parametri funzionali atti a definire gli eventi cardiorespiratori, in relazione alle varie fasi del sonno. Per poter essere considerata attendibile, la polisonnografia abbreviata dovrebbe durare almeno due ore ed includere almeno una fase REM stabile (almeno il 15% della durata del sonno).

Parametri registrati durante il sonno

Flusso oro-nasale: Esso viene misurato per valutare l'adeguatezza della ventilazione, la presenza di apnee centrali od ostruttive e per stabilirne la gravità. Sono attualmente disponibili numerose metodiche per la sua misurazione. Una misura quantitativa della riduzione di flusso oro-nasale viene realizzata mediante lo pneumotacografo; esso richiede tuttavia l'uso di una maschera facciale che rende tale metodica poco tollerabile dal paziente pediatrico e pertanto poco utilizzata. Dispositivi meno invasivi sono, invece, il termistore e la cannula nasale. Il termistore, posto in prossimità di ciascuna narice e della bocca, è in grado di rilevare alterazioni di temperatura associate alla respirazione; risulta tuttavia impreciso ed incapace di riconoscere gli episodi di parziale ostruzione delle vie aeree con riduzione del tidal

volume (ipopnee). Negli ultimi anni, un crescente numero di studi ha mostrato come la nasocannula (trasduttore di pressione nasale) sia capace di migliorare la valutazione dei disturbi respiratori identificando gli eventi ostruttivi parziali, apnee ed ipopnee, non identificati dal solo termistore. Essa è costituita da un sensore a tubicino che deve essere posizionato nelle narici e connesso ad un trasduttore di pressione capace di individuare i cambiamenti di pressione inspiratori ed espiratori. Risulta ben tollerata in età pediatrica e le sue limitazioni sono dovute al fatto che la respirazione orale, tanto frequente nel bambino, rende il segnale da essa registrato poco interpretabile. In ogni caso, al fine di non sovrastimare la diagnosi, si raccomanda di valutare gli eventi respiratori individuati dalla cannula nasale in relazione ad altri parametri concomitanti o a desaturazioni o ad arousal [9].

Movimento toracico e addominale e valutazione dello sforzo respiratorio: Il metodo più accurato per la valutazione quantitativa dello sforzo respiratorio è rappresentato dalla registrazione della pressione endoesofagea mediante sondino a palloncino. Essa risulta, tuttavia, in età pediatrica, poco confortevole e capace di indurre una frammentazione del sonno. Una misurazione semi-quantitativa del flusso d'aria e del tidal volume può essere inoltre registrata mediante pletismografia a induttanza. Essa permette, mediante l'utilizzo di due fasce, una toracica ed una addominale, di identificare le escursioni respiratorie permettendo di derivare il volume ed il flusso respiratori, al fine di individuare apnee ostruttive, ipopnee o apnee centrali [8].

Saturazione d'ossigeno: La metodica standard per la valutazione non

invasiva continua della saturazione arteriosa di ossigeno è rappresentata da un pulse-ossimetro dotato di sistemi di filtraggio degli artefatti da movimento. La sonda viene posizionata sul dito o sul piede (nei bambini più piccoli). Un altro metodo è quello transcutaneo (PtcO₂) che risulta tuttavia non adatto per il monitoraggio del comportamento dell'O₂ in quanto la trasformazione dei dati della PtcO₂ è troppo lenta per seguire i rapidi cambiamenti della saturazione associati alle apnee; inoltre la temperatura della sonda richiede, al fine di evitare lesioni cutanee, continui spostamenti [10].

Valutazione della CO₂: Il valore medio di plateau di CO₂ a fine espirazione (end tidal CO₂) rappresenta una buona misura della CO₂ alveolare e, di conseguenza, di quella arteriosa. Essa è utile nella valutazione delle apnee e delle ipoventilazioni, necessitando tuttavia una continua vigilanza del corretto posizionamento della sonda del capnografo. Nei bambini più piccoli, nei quali può risultare difficile il mantenimento di un catetere nasale, può essere utilizzato un sistema di monitoraggio transcutaneo della CO₂ (PtcCO₂). Essa risente dei medesimi limiti tecnici della PtcO₂. È raccomandato descrivere il tipo di metodica utilizzata, annotare il massimo valore di CO₂ registrato e realizzare un istogramma dei valori di CO₂ ottenuti durante l'esame [11-12].

Elettroencefalogramma: L'elettroencefalografia è una tecnica mediante la quale è possibile registrare dal cuoio capelluto l'attività elettrica cerebrale spontanea, a riposo. Tale registrazione è effettuata derivando, tramite elettrodi applicati su vari punti prestabiliti del cranio, le variazioni di potenziale elettrico degli elementi nervosi,

opportunamente amplificate. Le informazioni provenienti dall'EEG vengono utilizzate prevalentemente per la differenziazione dei vari stadi del sonno, nonostante la registrazione continua durante la notte possa dare utili informazioni su integrità e sviluppo del sistema nervoso centrale. La stadiazione del sonno è stata standardizzata per l'uso di un monitoraggio ridotto attraverso elettrodi applicati in posizione centrale paramediana (C3-C4), regione occipitale (O1-O2) e registrazioni referenziali con un elettrodo considerato indifferente applicato alla mastoide (A1-A2) secondo il sistema internazionale 10-20.

Elettrooculogramma: L'elettrooculogramma è usato per individuare i movimenti degli occhi utili alla stadiazione del sonno. La sua registrazione si basa sulla differenza di potenziale esistente tra cornea (positiva) e retina (negativa). Per la registrazione dei movimenti oculari sono necessari due elettrodi (E1, E2): uno dovrebbe essere posizionato 0,5 cm sopra e lateralmente al canto esterno di un occhio ed un altro 0,5 cm sotto e lateralmente al canto esterno dell'altro occhio. Sia i movimenti oculari verticali che quelli laterali possono essere riconosciuti mediante elettrodi referenziali a livello mastoideo (M1, M2). E1-M2 designato come L-EOG (Left Eye) e E2-M2 come R-EOG (Right Eye) [13].

Elettromiogramma L'elettromiografia fornisce utili informazioni per la stadiazione del sonno e per la valutazione delle risposte arousal e dei movimenti. La registrazione viene effettuata mediante elettrodi di superficie, applicati in corrispondenza del muscolo da esaminare. Benché l'attività elettromiografica durante il sonno possa essere

registrata da qualsiasi gruppo di muscoli scheletrici, è ormai prassi consolidata utilizzare i muscoli submentonieri per valutare il tono muscolare. L'EMG viene registrata da derivazioni bipolari fra elettrodi posti su muscoli submentonieri (miloioideo).

Elettrocardiogramma L'attività cardiaca viene monitorata per valutare frequenza e ritmo cardiaco, pertanto viene utilizzata una sola derivazione registrata mediante due elettrodi in sede precordiale. La derivazione ECG della polisonnografia fornisce unicamente informazioni di massima sull'attività cardiaca, non consentendo di trarre conclusioni cliniche su eventuali patologie di pertinenza cardiologica. Sono considerate bradicardie le riduzioni della frequenza cardiaca $> 30\%$ e di una durata maggiore di 5s, in relazione alla frequenza cardiaca del sonno ad onde lente. Esse si possono verificare in concomitanza ad apnee ostruttive, aritmie cardiache primitive dovute a difetti di conduzione e reflusso gastroesofageo. Le tachicardie sono, invece, incrementi della frequenza cardiaca $> 30\%$ e di una durata maggiore di 10 s, in relazione alla frequenza cardiaca del sonno ad onde lente.

Monitoraggio audio e video Essi sono importanti componenti dello studio in quanto possono fornire utili informazioni riguardo a disturbi del sonno, russamento, sforzi respiratori. e per escludere eventuali artefatti o alcuni eventi particolari quali, ad esempio, convulsioni. Il video può essere utilizzato per discriminare tra veglia e stadio 1 del sonno e per una corretta valutazione degli arousals [14].

La registrazione audio, ottenuta mediante un microfono posto in area sovra sternale, permette di avere informazioni aggiuntive sul grado e

sul tipo di russamento, anche se, in letteratura, non è riportata una correlazione tra indici rilevati al microfono e gravità del disturbo respiratorio [15].

Sensore di posizione Le informazioni riguardo la posizione corporea assunta durante il sonno sono importanti in particolare nei pazienti in cui la severità dell'ostruzione delle vie aeree superiori può influire sulla posizione corporea. Nei bambini, al contrario che negli adulti, la posizione supina permette di mantenere una maggiore pervietà delle vie aeree [16]. L'interpretazione dei dati polisonnografici e la conseguente refertazione devono essere eseguite mediante stadiazione manuale da parte del medico esperto; non sono ritenute sufficienti ed attendibili diagnosi basate sullo score automatico degli eventi da parte del polisonnografo. Importante valutare quella che è la stadiazione del sonno. La stadiazione del sonno viene effettuata in maniera simile all'adulto in bambini con età superiore ai 6 mesi; speciali criteri devono essere invece utilizzati per studiare il sonno nei neonati e nei lattanti inferiori a 6 mesi di vita [17].

I parametri importanti studiati attraverso la polisonnografia sono [8]:
Apnee centrali: assenza di movimenti della parete toracica ed addominale associata ad un'interruzione del flusso nasale/orale. Esse possono essere osservate come reperto occasionale, soprattutto in fase REM, in bambini di tutte le età; in genere esse sono della durata inferiore a 20 secondi e spesso successive ad un movimento corporeo. Le apnee centrali non possono essere considerate nella norma bensì patologiche se, a prescindere dalla loro durata, sono associate a

desaturazioni $> 4\%$ e a bradicardie e il loro verificarsi sia maggiore di 3 episodi per ora di sonno.

Apnee ostruttive: esse sono l'interruzione del flusso aereo oronasale dovuta ad una completa o parziale ostruzione a livello delle alte vie aeree, associata a sforzo respiratorio esagerato che esita in un movimento paradossale della gabbia toracica e dell'addome. Pochi secondi dopo l'apnea, che ha una durata media di 10-20 secondi, si osserva una caduta della SpO₂, più pronunciata nel lattante e più tardiva nel bambino più grande e nell'adolescente. La fine dell'apnea è spesso accompagnata da russamento e respiro rumoroso. In pochi secondi la SpO₂ risale ed il sonno continua. Normalmente i bambini non hanno eventi di questo genere durante il sonno; per questo motivo, la presenza di almeno un'apnea ostruttiva (indipendente dalla durata) per ora di registrazione è da considerarsi non fisiologica in età pediatrica

Ipopnee: esse sono la riduzione di almeno il 50% dell'ampiezza del segnale del flusso oronasale della durata di almeno due cicli respiratori ed è spesso associata ad arousals (microrisvegli) o ipossiemia (desaturazioni $>4\%$). Esse sono definite ostruttive se associate a movimenti in opposizione di fase di torace ed addome o centrali se si riscontra una riduzione in fase degli stessi segnali.

Indice d'apnea che sta ad indicare il numero di eventi ostruttivi per ora di sonno. Un indice di apnea ostruttiva >1 è da considerarsi non fisiologico in età pediatrica. IDR o Indice d'apnea + ipopnea o indice di disturbo respiratorio: indica il numero di eventi apnoici di qualsiasi natura + ipopnee per ora di sonno. Un indice IDR $> 1,3$ eventi/ora è

da considerarsi non fisiologico per l'età pediatrica. Attraverso l'analisi di questo indice si può quantificare la gravità di OSAS in: OSAS minima (IDR tra 1-3 e/o la presenza di russamento continuo per almeno il 50% del sonno associata a desaturazioni di O₂ superiori al 4% e con Sat O₂ media > 97%), OSAS lieve (IDR tra 3-5 e Sat O₂ media > 97%), OSAS moderata (IDR tra 5-10 e Sat O₂ media > 95%) e OSAS severa (IDR > 10 e Sat O₂ media < 95%).

La saturazione di O₂: il valore medio normalmente è maggiore del 94%. Una saturazione media inferiore al 94% ma maggiore del 90% è da considerarsi francamente patologica. In questi casi, è importante valutare anche il tempo assoluto e la percentuale passata nei vari range di saturazione. La saturazione minima (SaO₂ nadir) non deve essere inferiore al 93% nei maschi e al 94% nelle femmine. Normalmente desaturazioni >4% sono infrequenti nei bambini sani e qualora presenti non superano i 2 episodi per ora di sonno: per questo motivo, un numero di desaturazioni >2/h risulta patologico in età pediatrica. L'arousal: consiste in un episodio, della durata di almeno 3 secondi, di brusco aumento nella frequenza elettroencefalografia, accompagnato da un incremento in ampiezza dell'attività muscolare submentoniera; esso si verifica durante il sonno REM. Alcuni gruppi hanno adattato la definizione relativa all'adulto al bambino, riducendo la durata dei cambiamenti nel segnale EEG ad 1 secondo ed introducendo alcune variazioni nei parametri di scoring, considerando i processi di maturazione dell'attività bioelettrica cerebrale. Nei bambini più piccoli si può considerare arousal un'attività ritmica con frequenze superiori ai 16 Hz, mentre nei bambini più grandi anche una sequenza

di attività α (8-13 Hz) può essere considerata arousal. In età pediatrica più potenti stimoli di arousal sono rappresentati da un aumento delle resistenze delle alte vie e dall'ipercapnia.

Indagini sui tessuti umani in vitro

Estrazione RNA

L'RNA è stato estratto mediante il kit RNA easy Mini Kit (Qiagen, Milano Italia) a partire da 200 μ l di sangue periferico a cui sono stati addizionati 20 μ l di Proteinasi K e 180 μ l di buffer di lisi. Il lisato è stato omogenizzato mediante 5 passaggi in una siringa con ago da 20 Gauge ed è stato centrifugato per tre minuti alla massima velocità. Al sovra-natante vengono aggiunti 200 μ l di etanolo al 70% e il tutto è trasferito su colonnina e centrifugato a 10.000 rpm. Si procede con vari step di lavaggio, con l'aggiunta di 700 μ l di buffer RW1 e 500 μ l di buffer RPE (quest'ultimo viene aggiunto per 2 volte consecutive) centrifugando di volta in volta. Si trasferisce la colonnina in una nuova provetta e si aggiungono 30 μ l di acqua RNasi-free e si centrifuga per un minuto alla massima velocità per l'eluizione dell'RNA.

La concentrazione è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Analisi del profilo di espressione genica

Il profilo di espressione genica è stato valutato utilizzando i chip Human Transcriptome Arrays (HTA) di Affymetrix (Santa Clara, CA), che contiene più di 6 milioni di probe corrispondenti a più di 285

mila trascritti full length. L'RNA totale estratto dal sangue periferico è stato marcato utilizzando il WT Plus Reagent Kit, che prevede la retrotrascrizione a cDNA dell'RNA poli-A + e non-poli-A con primer contenenti la sequenza del promotore T7. Alla sintesi del cDNA a doppio filamento segue quindi la trascrizione in vitro a cRNA utilizzando la T7 RNA polimerasi e la successiva risintesi del cDNA a singolo filamento che viene quindi frammentato e marcato con nucleotidi coniugati alla biotina e ibridato ai chip. L'ibridazione overnight è seguita da una fase di staining dei campioni ibridati al chip con Streptavidina-Ficoeritrina, il cui segnale fluorescente viene letto dallo scanner laser, che genera in output un file di intensità di fluorescenza (CEL file).

L'analisi dei dati di espressione genica è stata effettuata applicando un workflow costruito ad hoc e che prevede esclusivamente l'utilizzo di strumenti bioinformatici open source. Nel dettaglio: i dati grezzi prodotti (CEL file) sono stati caricati all'interno dell'ambiente R e sottoposti ad una fase preliminare di sottrazione del segnale di background, normalizzazione e riduzione delle singole probe in probe set mediante il metodo RMA (Robust Multi-Array Average). Successivamente sono stati eliminati i probe set che presentavano una bassa variabilità tra i campioni, in particolare è stata calcolata la differenza interquartile (IQR) e sono stati filtrati quelli con IQR inferiore al decimo percentile dell'IQR globale. Inoltre sono stati eliminati tutti i probe set con livello di espressione inferiore a 5 in più di 2 campioni. Il data set così filtrato è stato analizzato per mettere in luce la differenza di espressione tra casi e controlli. A questo scopo è

stato calcolato un moderated t-statistic per campioni non accoppiati utilizzando le funzioni lmFit e eBayes del pacchetto limma (R-bioconductor) e considerando come soglia di significatività p-value < 0.05. I probe set differenzialmente espressi (corrispondenti ai rispettivi geni) sono stati classificati come overespressi ($\log FC > 1$) o downregolati ($\log FC < 1$). Successivamente e' stata effettuata un'analisi di Gene Ontology Terms enrichment mediante WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (<http://www.webgestalt.org/option.php>) e mediante Gene Set Enrichment Analysis () utilizzando il gene set di riferimento C2 che corrisponde al database MsigDB curato manualmente (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/collections.jsp>).

Visite e valutazioni

Lo schema delle visite e delle valutazioni vengono riassunto di seguito Tabella 1.

RISULTATI

Questo studio monocentrico esplorativo sui tessuti umani della durata di 3 anni, ha avuto inizio nel gennaio 2014, e si è concluso a dicembre 2016. E' stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria S.Orsola-Malpighi.

POPOLAZIONE STUDIATA

La popolazione in studio risulta essere costituita da pazienti del gruppo A e del gruppo B che sono stati arruolati in maniera progressiva. La popolazione in studio risulta essere costituita da 6 pazienti per il gruppo A e 6 per il gruppo B. Le due popolazioni sono sovrapponibili per età, sesso ed etnia.

ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA

La comparazione dell'espressione genica nei due gruppi di pazienti ha evidenziato come particolari geni risultino espressi in maniera significativamente differente tra casi e controlli. In particolare numerosi geni risultano essere espressi in maniera significativamente aumentata nei casi rispetto ai controlli. I geni che presentano una maggiore significatività risultano essere L5RA, PDK4, CLC, HRH4, IL1R1 (Tabella 2).

ANALISI DEI PATHWAYS CELLULARI

L'analisi dell'attivazione dei pathways cellulari ha evidenziato un'attivazione statisticamente significativa nei casi rispetto ai controlli

di pathways cellulari quali la risposta infiammatoria, la chemiotassi, la risposta immunitaria e la risposta allo stress (tabella 3).

Capitolo 3

Analisi critica dei risultati

DISCUSSIONE

Questo studio evidenzia il ruolo centrale che l'infiammazione presenta nella Sindrome delle apnee ostruttive. Studi su popolazioni adulti e su modelli animali hanno evidenziato che i ricorrenti episodi di ipossia e la frammentazione del studio, che caratterizzano la condizione, risultano nell'attivazione dell'espressione genica e di cascate cellulari con importanti effetti sul sistema cardiovascolare, neurocognitivo e metabolica [18]. Lo spettro clinico del disturbo è eterogeneo e comprende manifestazioni neuro-comportamentali (iperattività, deficit dell'attenzione, sonnolenza diurna, ADHD, aumento dell'aggressività, alterazione della performance scolastica), cardiovascolari (aumento della pressione arteriosa, disfunzione del compartimento cardiaco sinistro e/o destro) ed alterazioni della crescita. Dalla letteratura emerge come OSAS debba essere considerato un disordine infiammatorio cronico con aumentato stress ossidativo che determina le sequele a lungo termine sopramenzionate. A livello locale l'ossido nitrico nasale, un marker dell'infiammazione delle vie aeree, è elevato nei pazienti con OSAS rispetto ai controlli sani [19]. I livelli di H₂O₂ nei campioni mattutini di respiro condensato nei pazienti con OSAS presentano livelli elevati, segno di stress ossidativo [20]. I livelli serici di citochine pro-infiammatorie quali TNF- α , IL-6 e IL-8 sono maggiori nei pazienti con OSAS [21], mentre i livelli di citochine regolatorie, come IL-10, risultano essere ridotti e correlano con la gravità di OSAS [22]. Ulteriore segno di stato pro-infiammatorio del disordine è lo switch Th17/Treg verso una predominanza Th17 in

OSAS, in particolare il Th17/Treg ratio correla con la severità del disordine e dopo l'adenotonsillectomia tale indice si ribalta con riduzione dei livelli serici di citochine infiammatorie [23]. Fattori genetici hanno un ruolo importante, in particolare un polimorfismo a singolo nucleotide nella regione codificante del gene TNF- α (308A) SNP appare essere significativamente associato a OSAS [24]. Alterazioni epigenetiche in OSAS sono per esempio l'aumento dei livelli di metilazione della regione del promotore del gene FOXP3, che ha un ruolo cruciale nello sviluppo delle cellule T regolatorie [25]. E' stato postulato che l'induzione di cascate infiammatorie associate ad aumento dello stress ossidativo abbiano un ruolo importante nella genesi delle complicanze a lungo termine del disturbo [21]. In questo scenario è importante investigare bambini con OSAS per valutare se il quadro clinico e le sequele a lungo termine del disturbo possano essere correlate alla diversa espressione di specifici geni con conseguente attivazione di diverse vie infiammatorie e metaboliche. Il nostro studio ha evidenziato l'espressione significativamente aumentata nei casi rispetto ai controlli di particolari geni connessi con la risposta immunitaria e/o l'infiammazione e l'attivazione di specifici pathways cellulari come la risposta infiammatoria, la chemiotassi, la risposta immunitaria e la risposta allo stress. In dettaglio le caratteristiche dei principali geni che risultano essere sovra-espressi nei pazienti OSAS.

Gene Subunità alfa del recettore per l'interleuchina 5

La subunità alfa del recettore per l'interleuchina 5 (IL5RA), anche conosciuta come CD125 (Cluster of Differentiation 125) è una subunità

del recettore dell'interleuchina 5. Il gene codifica per una proteina facente parte del recettore che risulta composto da specifici ligandi [26]. La subunità alfa del recettore per l'interluchina 5 interagisce con:

- Interleuchina 5 [27-29]
- Janus kinase 2 [30]
- Protein unc-119 homolog,[31]
- SDCBP [32]

IL-5R α è esclusivamente espresso dagli eosinofili, dai basofili e dai precursori delle cellule B [33]. IL-5 e la porzione intracellulare di IL-5R α sono associate con Janus kinase (JAK) 2, una tirosina chinasi che è essenziale nel meccanismo di trasduzione del segnale di IL-5 [34]. Come descritto dalla tabella 4 [35] IL-5R α risulta essere necessario nella differenziazione eosinofila e presenta un ruolo importante in patologie quali asma, eczema, poliposi nasale, rinocongiuntivite [36-40].

PDK4: Piruvato deidrogenasi lipoamide chinasi isoenzima 4

La Piruvato deidrogenasi lipoamide chinasi isoenzima 4 (PDK4) è un enzima codificato dal gene PDK4 gene [41-42]. Questo gene è un membro della famiglia delle protein chinasi PDK/BCKDK e codifica per una proteina mitocondriale con un dominio istadino-chinasi. Tale proteina è localizzata nella matrice dei mitocondri e inibisce il complesso piruvato chinasi fosforilando una delle sue subunità e riducendo la conversione del piruvato, che è prodotto dall'ossidazione del glucosio e degli aminoacidi, a acetyl-CoA; inoltre contribuisce alla regolazione del metabolismo del glucosio. L'espressione di questo gene è regolata dai glucocorticoidi, dall'acido retinoico e dall'insulina.

L'espressione di PDK4 è aumentata nell'ibernazione e aiuta a diminuire il metabolismo e a conservare il glucosio riducendo la conversione ad acetyl-CoA [43]. La proteina matura codificata dal gene PDK4 gene contiene 294 aminoacidi nella sua sequenza, due catene polipeptidiche costituiscono insieme una conformazione aperta. In specifico le due subunità formano un "pacchetto legante un nucleotide" e tale pacchetto è spesso il target per gli inibitori [44]. Il complesso della piruvato deidrogenasi deve essere altamente regolato sulla base del suo ruolo centrale nel metabolismo. All'interno del complesso ci sono tre residui di serina sulla componente E1 che sono siti di fosforilazione; questa fosforilazione inattiva il complesso. Negli umani ci sono quattro isoenzimi di piruvato deidrogenasi che mostrano di fosforilare questi tre siti PDK1, PDK2, PDK3, and PDK4. PDK4 non incorpora i gruppi fosfati per gli eventi catalitici, perchè possono essere fosforilati i siti 1 e 2; questa quota di fosforilazione è minore di PDK1, uguale a PDK3, e maggiore di PDK2 [45]. Come regolatori primari di step cruciali di pathways metabolici, la famiglia delle piruvato chinasi è strettamente regolato da svariati fattori tra cui i fattori di trascrizione Sp1 e CBF. L'acido retinoico aumenta la trascrizione di PDK4 reclutando cofattori per il promotore del PDK4. Il processo di trascrizione è inoltre aumentato dall'inibizione dell'istone acetiltransferasi [46]. Rosiglitazone, a thiazolidinedione attivano i pathways di biosintesi del glicerolo, aumentando la trascrizione del PDK4 nel tessuto adiposo [47]. Rapidi dimagrimenti inducono un aumento della trascrizione di PDK4 [48]. Il recettore Farnesoid X, insulina sono modulatori negativi dell'espressione di

PDK4 [49-50]. PDK4 ricopre un ruolo importante in svariate condizioni cliniche; PDK4 è sovraespresso nel muscolo scheletrico nel diabete di tipo 2 [51]. Nei pazienti post-obesi è presente una significativa diminuzione dell'espressione di PDK4 [52]. L'esercizio fisico e l'ipossia aumentano l'espressione di questo gene [53,54,55]. PDK4 sembra abbia un ruolo nel promuovere l'oncogenesi [56-57].

HRH4: Il recettore H4

Il recettore H4 è un recettore dell'istamina, un membro della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G.[58-60]

Distribuzione nei tessuti

Il recettore H4 è altamente espresso nel midollo osseo e sui leucociti, e nei modelli sperimentali su topi di pleurite indotta da zymosan, regola il rilascio dei neutrofili dal midollo osseo e la loro successiva infiltrazione [61]. È espresso anche in colon, fegato, polmoni, intestino tenue, milza, testicoli, timo, tonsille e trachea [62]. Il recettore dell'istamina H4 ha dimostrato di essere coinvolto nella mediazione del cambiamento di forma degli eosinofili e nella chemiotassi dei mastociti [63]. Quest'ultima avviene tramite la subunità $\beta\gamma$ agente presso la fosfolipasi C, causando la polimerizzazione dell'actina e infine la chemiotassi. La struttura 3D del recettore H4 non è stata ancora definita a causa delle difficoltà relative alla cristallizzazione dei recettori accoppiati a proteine G. Sono stati fatti alcuni tentativi di sviluppo di modelli strutturali del recettore H4 per scopi diversi. Il primo modello di recettore H4 [64] è stato costruito da modellazioni omologhe basate sulla struttura cristallina della rodopsina bovina.[65] Questo modello è stato

utilizzato per l'interpretazione dei dati sulla mutagenesi sito-diretta, che hanno rivelato l'importanza cruciale dei residui Asp94 (3.32) e Glu182 (5.46) nell'attivazione del recettore H4 e nei suoi legami coi ligandi. Un secondo modello strutturale del recettore H4 basato sulla rodopsina è stato utilizzato con successo per l'identificazione di nuovi ligandi di H4 [66]. I recenti progressi nella cristallizzazione, e in particolare la determinazione del complesso del recettore dell'istamina umana H1 con la doxepina [67] probabilmente aumenteranno la qualità dei nuovi modelli strutturali del recettore H4. Come potenziale terapeutico inibendo il recettore H4 si possono trattare asma e allergie. [68]. L'antagonista altamente selettivo di H4 VUF-6002 è attivo per via orale e inibisce l'attività sia dei mastociti che degli eosinofili in vivo [69] ed ha effetti antinfiammatori [70].

CLC4: Chemochina (C-C motif) ligando 4

La Chemochina (C-C motif) ligando 4 (CCL4) è una proteina codificata dal gene CCL4 [71]. CCL4 è una chemochina con specificità per i recettori CCR5. Stimola la chemiotassi delle cellule natural killer, monociti e svariate altre cellule immunitarie [72]. La proteina ha un ruolo cruciale nella risposta immunitaria in corso di infezione e nell'infiammazione, infatti attiva i granulociti (neutrofili, eosinofili e basofili [73]. Inoltre induce il rilascio di altri fattori pro infiammatori come IL-1, IL-6 and TNF- α da parte dei fibroblasti e dei macrofagi [74].

IL1R1: recettore dell'interleuchina 1

Il recettore dell'interleuchina 1, è una proteina codificata dal gene IL1RL1 [75-76]. IL1RL1 è un membro della famiglia dei Toll-like e

svolge il suo ruolo proinfiammatorio attivando MAP chinasi [77]. La proteina presenta due isoforme ed è direttamente implicata nella progressione della malattia cardiaca. Quando il miocardio viene danneggiato il gene IL1RL1 viene upregolato, con aumento del livello circolante di proteina [78]. Il ligando della proteina è IL-33, interleuchina che presenta un effetto cardioprotettivo. L'aumento di livelli della proteina IL1RL1, satura il ligando IL-33 con conseguente impossibilità di espletamento della sua funzione protettiva. Come risultato il cuore è maggiormente soggetto a stress, in presenza di alti livelli di IL1RL1.

CONCLUSIONI

Il nostro studio ha evidenziato una up-regulation di geni pro-infiammatori nei casi affetti da OSAS rispetto ai controlli sani. Questa espressione aumentata induce un'attivazione di pathways cellulari specifici quali la risposta infiammatoria nel suo complesso e nelle sue componenti più specifiche come la chemiotassi. I nostri risultati confermano come si debba considerare OSAS come un “low-grade inflammatory disease”, condizione che comporta una comorbidità sistemica rilevante (metabolica, cardiovascolare e neuro-comportamentale), data la robusta relazione tra lo stato pro-infiammatorio e le sequele sistemiche a lungo termine. Limite del nostro studio risulta essere la scarsa numerosità del campione in oggetto.

Tabelle e Grafici

Numero della visita	Visita selezione	Ricovero
Consenso Informato	X	
SCS	X	
Storia clinica	X	
Criteri di incl./escl.	X	
Esame Obiettivo	X	X
Terapie concomitanti in atto	X	X
Raccolta campioni ematici		X
Polisonnografia		X

Tabella 1: schema visite/valutazioni

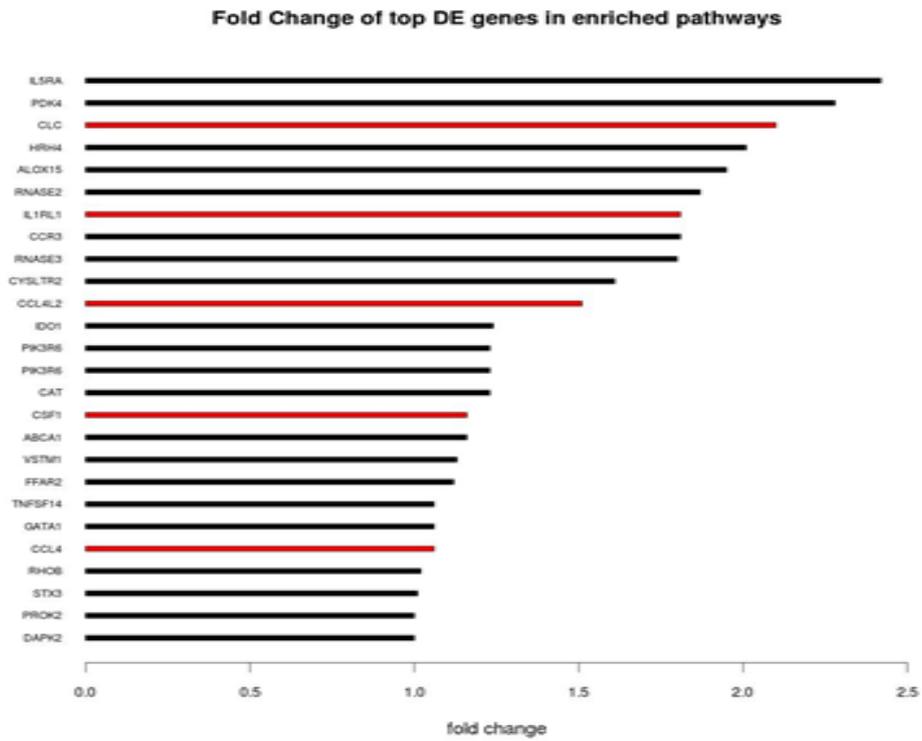


Tabella 2: Risultati di analisi di espressione genica

Pathway	FDR q-value	Enrichment
inflammatory response	1,84E-008	6,1
taxis	0,000000136	7,04
defense response	0,000000145	3,64
chemotaxis	0,000000193	7,07
cytokine-mediated signaling pathway	0,0000234	4,76
chemokine-mediated signaling pathway	0,0000421	13,53
immune system process	0,00012	2,51
regulation of immune system process	0,000168	2,73
regulation of leukocyte chemotaxis	0,000188	10,47
response to stress	0,000292	2,04
cell chemotaxis	0,000418	7,04
regulation of chemotaxis	0,000592	6,76
immune response	0,00677	2,72
regulation of granulocyte chemotaxis	0,00747	14,62
regulation of defense response	0,00818	3,06
myeloid leukocyte migration	0,00826	8,14
	0,00918	9,99
mononuclear cell migration	0,00965	13,53

Tabella 3: Risultati di analisi del pathways cellulari

Eosinophil Differentiation

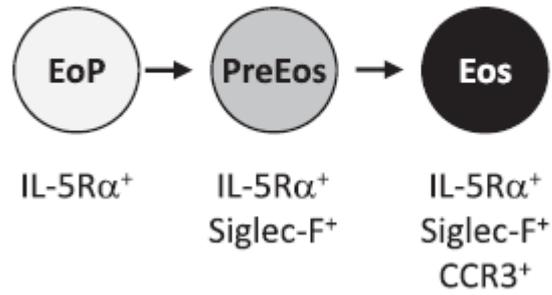


Tabella 4: Differenziazione eosinoflica in colture midollari [35]

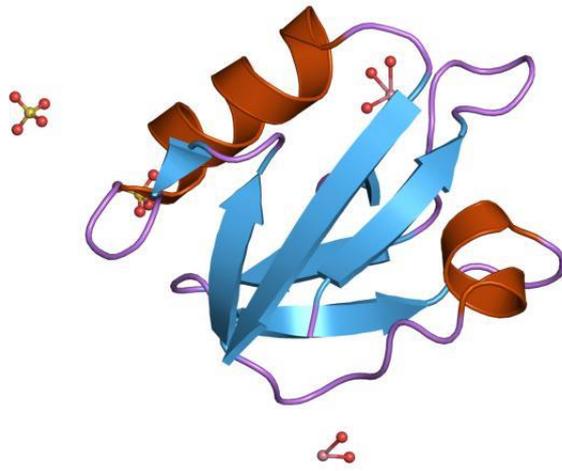


Figura 1: proteina codificata dal gene IL5RA

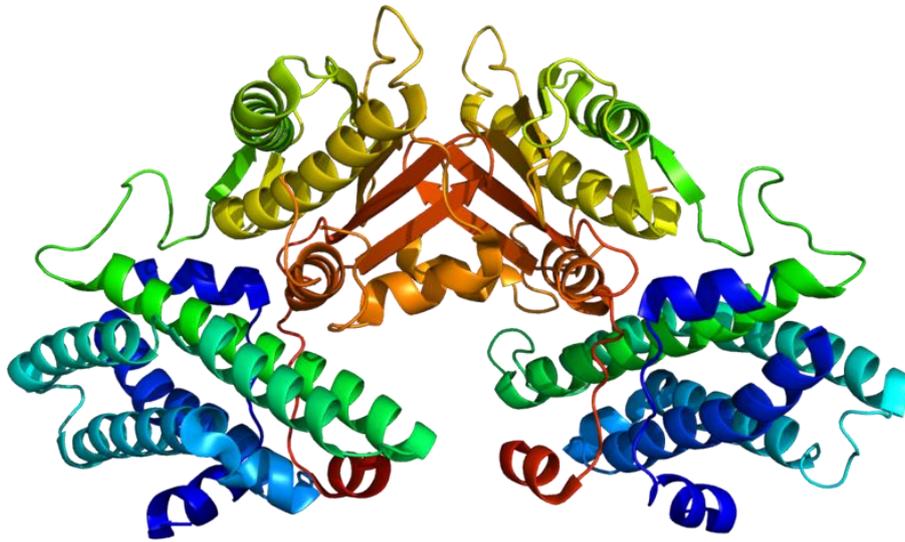


Figura 2: proteina codificata dal gene PDK4

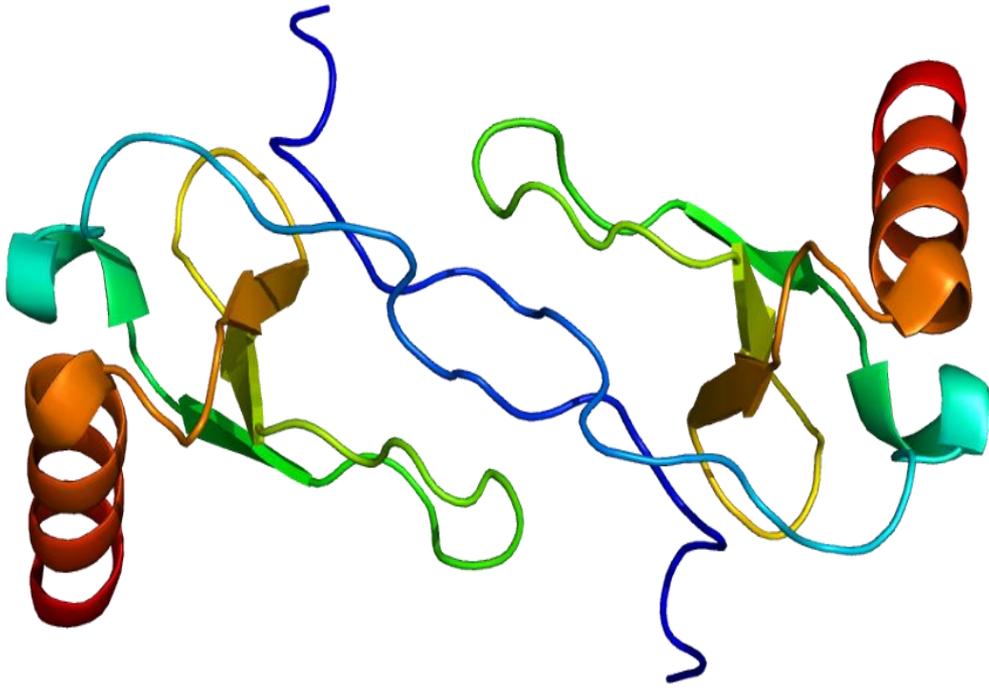


Figura 3: proteina codificata dal gene CLC4

BIBLIOGRAFIA

- [1] Kaditis AG, Alonso Alvarez ML, Boudewyns A, Alexopoulos EI, Ersu R, Joosten K, Larramona H, Miano S, Narang I, Trang H, Tsaoussoglou M, Vandenbussche N, Villa MP, Van Waardenburg D, Weber S, Verhulst S. Obstructive sleep disordered breathing in 2- to 18-year-old children: diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016;47:69-94.
- [2] Bonuck KA, Chervin RD, Cole TJ, Emond A, Henderson J, Xu L, Freeman K. Prevalence and persistence of sleep disordered breathing symptoms in young children: a 6-year population-based cohort study. *Sleep*. 2011;34:875-84.
- [3] Brockmann PE, Urschitz MS, Schlaud M, Poets CF. Primary snoring in school children: prevalence and neurocognitive impairments. *Sleep Breath*. 2012;16:23-29.
- [4] Lumeng JC, Chervin RD. Epidemiology of pediatric obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:242-52.
- [5] Marcus CL, Brooks LJ, Draper KA, Gozal D, Halbower AC, Jones J, Schechter MS, Ward SD, Sheldon SH, Shiffman RN, Lehmann C, Spruyt K; American Academy of Pediatrics. Diagnosis and management of childhood obstructive sleep apnea syndrome. *Pediatrics*. 2012;130:714-55.
- [6] Slaats MA, Van Hoorenbeeck K, Van Eyck A, Vos WG, De Backer JW, Boudewyns A, De Backer W, Verhulst SL. Upper airway imaging in pediatric obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med Rev*. 2015;21:59-71.

- [7] Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am Resp Crit Care Med.* 2002 165:1217-39.
- [8] Villa MP, Brunetti L, Bruni O, Cirignotta F, Cozza P, Donzelli G, Ferini Strambi L, Levrini L, Mondini S, Nespoli L, Nosetti L, Pagani J, Zucconi M; Gruppo di Studio Interdisciplinare Disturbi Respiratori nel Sonno. Linee guida per la diagnosi della sindrome delle apnee ostruttive nel sonno in età pediatrica. *Minerva Pediatrica.* 2004,56:239-259.
- [9] Serebrisky D, Cordero R, Mandeli J, Kattan M, Lamm C. Assesment of inspiratory flow limitation in children with sleep-disordered breathing by a nasal cannula pressure transducer in infant and children. *Am J Respir Crit care Med.* 2002;166:464-68.
- [10] Gaultier C. Respiratory tests in sleep disorders in children. *Rev Mal Respir.* 2000;17:933-9.
- [11] Wiater A and Niewert HJ (together with the Pediatric Task Force in the German Sleep Society-DGSM-) Ploysomnographic standards for Infants and Children 2000; 4:39-42.
- [12] Morielli A, Desjardins D, Brouillette RT. Trancutaneus end-tidal carbon dioxide pressure should be measured during pediatric polysomnography *Am Rev Resp Dis.* 1993;184:1599-1604.
- [13] Grigg-Damberger M, Gozal D, Marcus CL, Quan SF, Rosen CL, Chervin RD, Wise M, Picchiatti DL, Sheldon SH, Iber C. The visual Scoring of Sleep and Arousal in Infants and Children. *J Clin Sleep Medicine.* 2007;3:201-39.

- [14] Mograss MA, Ducharme FM, Brouillette RT. Movement/arousals. Description, classification, and relationship to sleep apnea in children. *Am J respir Crit Care Med* 1994;150:1690-96.
- [15] Brunetti L, Rana S, Lospalluti ML, Pietrafesa A, Francavilla R, Fanelli M, Armenio L. Prevalence of obstructive sleep-apnea syndrome in a cohort of 1207 children of Southern Italy. *Chest* 2001; 120:1930-35.
- [16] Fernandes DO Prado LD, Li X, Thompson R, Marcus CL. Body position and obstructive sleep apnea in children. *Sleep*. 2002;25:66-71.
- [17] Royal College of Paediatrics and Child Health. Working Party on Sleep Physiology and Respiratory Control Disorders in Childhood – Report- September 2009.
- [18] Tan HL, Gozal D, Kheirandish-Gozal L. The Status of Pediatric Obstructive Sleep Apnea in 2015: Progress? YES!! More Questions? Definitely YES!! *Curr Sleep Medicine Rep*. 2016; 2:20–30.
- [19] Gut G, Tauman R, Greenfeld M, Armoni-Domany K, Sivan Y. Nasal nitric oxide in sleep-disordered breathing in children. *Sleep Breath*. 2016;20:303-08.
- [20] Malakasioti G, Alexopoulos E, Befani C, Tanou K, Varlami V, Ziogas D, Liakos P, Gourgoulisanis K, Kaditis AG. Oxidative stress and inflammatory markers in the exhaled breath condensate of children with OSA. *Sleep Breath*. 2012;16:703-08.
- [21] Dehlink E, Tan HL. Update on paediatric obstructive sleep apnoea. *J Thorac Dis*. 2016;8:224-35.

- [22] Leon-Cabrera S, Arana-Lechuga Y, Esqueda-León E, Terán-Pérez G, Gonzalez-Chavez A, Escobedo G, Velázquez Moctezuma J. Reduced systemic levels of IL-10 are associated with the severity of obstructive sleep apnea and insulin resistance in morbidly obese humans. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:493409.
- [23] Ye J, Liu H, Li P, Chen ZG, Zhang GH, Yang QT, Li Y. CD4(+) T-lymphocyte subsets in nonobese children with obstructive sleep apnea syndrome. *Pediatr Res.* 2015;78:165-73.
- [24] Bielicki P, MacLeod AK, Douglas NJ, Riha RL. Cytokine gene polymorphisms in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Sleep Med.* 2015;16:792-95.
- [25] Kim J, Bhattacharjee R, Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, Wang Y, Gozal D. DNA methylation in inflammatory genes among children with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185:330-38.
- [26] Entrez Gene: IL5RA interleukin 5 receptor, alpha
- [27] Woodcock JM, Zacharakis B, Plaetinck G, Bagley CJ, Qiyu S, Hercus TR, Tavernier J, Lopez AF. Three residues in the common beta chain of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors are essential for GM-CSF and IL-5 but not IL-3 high affinity binding and interact with Glu21 of GM-CSF". *EMBO J.* 1994; 13: 5176–85.
- [28] Johanson K, Appelbaum E, Doyle M, Hensley P, Zhao B, Abdel-Meguid SS, Young P, Cook R, Carr S, Matico R. Binding interactions of human interleukin 5 with its receptor alpha subunit. Large scale production, structural, and functional studies of *Drosophila*-expressed recombinant proteins". *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 9459–71.

- [29] Murata Y, Takaki S, Migita M, Kikuchi Y, Tominaga A, Takatsu K. Molecular cloning and expression of the human interleukin 5 receptor. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 341–51.
- [30] Ogata N, Kouro T, Yamada A, Koike M, Hanai N, Ishikawa T, Takatsu K. JAK2 and JAK1 constitutively associate with an interleukin-5 (IL-5) receptor alpha and beta subunit, respectively, and are activated upon IL-5 stimulation". *Blood.* 1998; 91: 2264–71.
- [31] Cen O, Gorska MM, Stafford SJ, Sur S, Alam R. Identification of UNC119 as a novel activator of SRC-type tyrosine kinases". *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 8837–45.
- [32] Geijsen N, Uings IJ, Pals C, Armstrong J, McKinnon M, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Cytokine-specific transcriptional regulation through an IL-5Ralpha interacting protein. *Science.* 2001; 293: 1136–38.
- [33] Geijsen N, Koenderman L, Coffey PJ. Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family". *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12: 19–25.
- [34] Takaki S, Kanazawa H, Shiiba M, Takatsu K. A critical cytoplasmic domain of the interleukin-5 (IL-5) receptor alpha chain and its function in IL-5-mediated growth signal transduction". *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 7404–13.
- [35] Fulkerson PC, Schollaert KL, Bouffi C, Rothenberg ME. IL-5 triggers a cooperative cytokine network that promotes eosinophil precursor maturation. *J Immunol.* 2014; 105:4043-52.

- [36] Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. IL5RA polymorphisms, smoking and eczema in Japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. *Int J Immunogenet.* 2015;42:52-7.
- [37] Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. Case-control study of rhinoconjunctivitis associated with IL5RA polymorphisms in Japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. *Cytokine.* 2014;65:138-42.
- [38] Losol P, Kim SH, Shin YS, Ye YM, Park HS. A genetic effect of IL-5 receptor α polymorphism in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Exp Mol Med.* 2013; 8;45.
- [39] Semic-Jusufagic A, Gevaert P, Bachert C, Murray C, Simpson A, Custovic A. Increased serum-soluble interleukin-5 receptor alpha level precedes the development of eczema in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21:1052-58.
- [40] Gevaert P, Hellman C, Lundblad L, Lundahl J, Holtappels G, van Cauwenberge P, Tavernier J, Bachert C. Differential expression of the interleukin 5 receptor alpha isoforms in blood and tissue eosinophils of nasal polyp patients. *Allergy.* 2009; 64:725-32.
- [41] Gudi R, Bowker-Kinley MM, Kedishvili NY, Zhao Y, Popov KM. Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans. *J Biol Chem.* 1995, 270: 28989–94.
- [42] Entrez Gene: PDK4 pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4.
- [43] Andrews MT, Squire TL, Bowen CM, Rollins MB. Low-temperature carbon utilization is regulated by novel gene activity in the heart of a hibernating mammal". *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95: 8392–97

[44] Kukimoto-Niino M, Tokmakov A, Terada T, Ohbayashi N, Fujimoto T, Gomi S, Shiromizu I, Kawamoto M, Matsusue T, Shirouzu M, Yokoyama S. Inhibitor-bound structures of human pyruvate dehydrogenase kinase 4. *Acta Crystallographica Section D*. 2011; 67: 763–73.

[45] Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Bioc J*. 2001; 358: 69–77.

[46] Kwon HS, Huang B, Ho Jeung N, Wu P, Steussy CN, Harris RA. Retinoic acids and trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, induce human pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) gene expression". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1759 (3-4): 141–51.

[47] Cadoudal T, Distel E, Durant S, Fouque F, Blouin JM, Collinet M, Bortoli S, Forest C, Benelli C. Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes*. 2008; 57: 2272–79.

[48] Spriet LL, Tunstall RJ, Watt MJ, Mehan KA, Hargreaves M, Cameron-Smith D. Pyruvate dehydrogenase activation and kinase expression in human skeletal muscle during fasting. *J Applied Physiology*. 2004; 96: 2082–87.

[49] Savkur RS, Bramlett KS, Michael LF, Burris TP. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by the farnesoid X

receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 329: 391–96.

[50] Kwon HS, Huang B, Unterman TG, Harris RA. Protein kinase B- α inhibits human pyruvate dehydrogenase kinase-4 gene induction by dexamethasone through inactivation of FOXO transcription factors". *Diabetes*. 2004; 53: 899–910.

[51] Wynn RM, Kato M, Chuang JL, Tso SC, Li J, Chuang DT. Pyruvate dehydrogenase kinase-4 structures reveal a metastable open conformation fostering robust core-free basal activity. *J Biol Chem*. 2008; 283: 25305–15.

[52] Rosa G, Di Rocco P, Manco M, Greco AV, Castagneto M, Vidal H, Mingrone. Reduced PDK4 expression associates with increased insulin sensitivity in postobese patients. *Obesity Research*. 2003; 11: 176–82.

[53] Pilegaard H, Ordway GA, Saltin B, Neufer PD. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise". *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2000; 279: E806–14. 19

[54] Wang L, Sahlin. The effect of continuous and interval exercise on PGC-1 α and PDK4 mRNA in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *Acta Physiologica*. 2012; 204: 525–32.

[55] Lee JH, Kim EJ, Kim DK, Lee JM, Park SB, Lee IK, Harris RA, Lee MO, Choi HS. Hypoxia induces PDK4 gene expression through induction of the orphan nuclear receptor ERR γ . *PLOS ONE*. 2012; 7 (9): e46324.

- [56] Blouin JM, Penot G, Collinet M, Nacfer M, Forest C, Laurent-Puig P, Coumoul X, Barouki R, Benelli C, Bortoli S. Butyrate elicits a metabolic switch in human colon cancer cells by targeting the pyruvate dehydrogenase complex". *International Journal of Cancer*. J International Du Cancer. 2011 ; 128: 2591–601.
- [57] Liu Z, Chen X, Wang Y, Peng H, Wang Y, Jing Y, Zhang H. PDK4 protein promotes tumorigenesis through activation of cAMP-response element-binding protein (CREB)-Ras homolog enriched in brain (RHEB)-mTORC1 signaling cascade. *J of Biol Chem*. 2014; 289: 29739–49.
- [58] Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes, in *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 47, 2000, pp. 36781–6.
- [59] Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R, in *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 279, n° 2, 2000, pp. 615–20.
- [60] Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF, Discovery of a novel member of the histamine receptor family (abstract), in *Mol. Pharmacol.*, vol. 59, n° 3, 2001, pp. 427–33.
- [61] Takeshita K, Bacon KB, Gantner F. Critical role of L-selectin and histamine H4 receptor in zymosan-induced neutrophil recruitment from the bone marrow: comparison with carrageenan, in *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 310, n° 1, 2004, pp. 272–80.

- [62] Bioreagents.com: Histamine H4 Receptor
- [63] Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung WP. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells, in *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 305, n° 3, 2003, pp. 1212–21.
- [64] Shin N, Coates E, Murgolo NJ, Morse KL, Bayne M, Strader CD, Monsma FJ. Molecular modeling and site-specific mutagenesis of the histamine-binding site of the histamine H4 receptor, in *Mol. Pharmacol.*, vol. 62, n° 1, luglio 2002, pp. 38–47.
- [65] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M, Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, in *Science*, vol. 289, n° 5480, agosto 2000, pp. 739–45.
- [66] Kiss R, Kiss B, Könczöl A, Szalai F, Jelinek I, László V, Noszál B, Falus A, Keseru GM. Discovery of novel human histamine H4 receptor ligands by large-scale structure-based virtual screening, in *J. Med. Chem.*, vol. 51, n° 11, giugno 2008, pp. 3145–53.
- [67] Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC, Iwata S, Structure of the human histamine H(1) receptor complex with doxepin, in *Nature*, vol. 475, n° 7354, giugno 2011.
- [68] InterPro: IPR008102 Histamine H4 receptor.
- [69] Varga C, Horvath K, Berko A, Thurmond RL, Dunford PJ, Whittle BJ. Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat. *European J of Pharm.* 2005 17; 522:130-8.

- [70] Coruzzi G, Adami M, Guaita E, de Esch IJ, Leurs R. Antiinflammatory and antinociceptive effects of the selective histamine H4-receptor antagonists JNJ7777120 and VUF6002 in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation. *European J Pharmac.* 2007; 563:240-44.
- [71] Irving SG, Zipfel PF, Balke J, McBride OW, Morton CC, Burd PR, Siebenlist U, Kelly K. Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 3261–70.
- [72] Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4". *Nat. Immunol.* 2001; 2: 1126–32.
- [73] Ren M, Guo Q, Guo L, Lenz M, Qian F, Koenen RR, Xu H, Schilling AB, Weber C, Ye RD, Dinner AR, Tang WJ. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J.* 2010; 29: 3952–66.
- [74] Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 1882–86.
- [75] Tominaga S, Yokota T, Yanagisawa K, Tsukamoto T, Takagi T, Tetsuka T. "Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2". *Biochim. Biophys. Acta.* 1992; 1171: 215–18.
- [76] Dale M, Nicklin MJ. Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q. *Genomics.* 1999; 57 (1): 177–79.

[77] Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, Liew FY. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat. Immunol.* 2004, 5: 373–79.

[78] Braunwald, Eugene. *Heart Failure. JACC: Heart Failure.* 2013; 1: 1–20.