

miogena. Il dosaggio degli anticorpi anti-recettore dell' acetilcolina, il test al Tensilon, l'elettro-neurografia, l'elettrocardiogramma, l'ecocardiogramma, le prove di funzionalità respiratoria e la RM

encefalo ed orbite sono normali. Il paziente viene sottoposto a biopsia muscolare. Si discutono le possibilità diagnostiche.

AIM Communications

Le “morulae” dei muscoli umani affetti da ALS sono miofibre denervate da 5 anni

Adami N*, Zampieri S*, Kern H[^], Carraro U*

**Laboratory of Translational Myology, Interdepartmental Research Center of Myology of the University of Padua, and Italian C.N.R. Institute of Neuroscience, c/o Department of Biomedical Science, Padova, Italy;*

[^]Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Wilhelminenspital, Vienna, Austria

Abbiamo eseguito analisi istochimiche ed immunostochimiche su biopsie muscolari di pazienti con lesioni al midollo spinale (LMS) per stabilire se grandi fibre muscolari presenti dopo due anni di Stimolazione Elettrica Fun-zionale (FES) siano il risultato di innervazione residua/reinnervazione o se rappresentino una delle osservazioni più significative, rese possibili dalla nostra banca di muscoli denervati da lungo tempo. La microscopia ottica ed elettronica dimostra che la positività del sarcolemma all'anticorpo anti-NCAN, un noto marcatore di denervazione muscolare, scompare dopo un anno dalla LMS, mentre compare un nuovo indicatore di denervazione: la differenziale marcatura della distrofina sarcolemmale con anticorpo anti-C (assente) ed anti-N (presente) terminale. Queste caratteristiche sono temporalmente correlate con la scomparsa dell'attività ATPasica acido-resistente nelle miofibre di tipo I e con la drastica riduzione tanto dell'attività ATPasica di tipo II quanto della SDH. Le fibre muscolari umane denervate da 5 o più anni presentano le caratteristiche dell'atrofia severa: perdono l'apparato miofibrillare, presentando in sezione trasversa gli aspetti caratteristici delle “morulae”. Questo stadio molto tardivo dell'atrofia da denervazione compare 4-5 anni dopo il trauma spinale e scompare solo dopo più di dieci anni, quando la fibrosi subentra alla lipodistrofia neurogena. Dopo anni di FES-training (con un protocollo giornaliero di stimolazione), questi aspetti sono molto rari, mentre la maggior parte del tessuto muscolare consiste di fibre di notevole dimensione, che hanno cioè recuperato la struttura fine e la massa, fino al livello delle fibre muscolari da noi descritte nella paraplegia spastica a lungo termine (15-20 anni dalla LMS). Questi risultati dimostrano quindi che le “morulae” presenti nella SLA, un'atrofia muscolare neurogena, sono gli aspetti in sezione trasversa di fibre muscolari denervate da 3-5 anni nell'uomo e da 8-12 mesi nel ratto sciectomizzato.

Studio dell'espressione genica del muscolo scheletrico in pazienti affetti da Glicogenosi II

Aguennouz M*, Musumeci O*, Mongini T[^], Lanzano N*, Rodolico C*, Ciranni A*, Palmucci L[^], Vita G*, Toscano A*

**Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Psichiatriche ed Anestesiologiche, Università degli Studi di Messina; [^]Dipartimento di Neuroscienze, Osp. “Le Molinette”, Università di Torino, Italia*

La glicogenosi di tipo II (GSD II) è una malattia da accumulo di glicogeno, dovuta al deficit dell'enzima lisosomale α -glucosidasi (GAA). La forma adulta presenta notevole eterogeneità clinica e si può manifestare come una miopatia dei cingoli lentamente evolutiva con o senza interessamento respiratorio. Casi asintomatici possono essere diagnosticati per un occasionale riscontro di iperCKemia. Gli aspetti morfologici muscolari possono essere estremamente variabili: da casi di miopatia vacuolare con marcato accumulo di glicogeno fino a minime alterazioni del calibro delle fibre con lieve o assente accumulo di glicogeno. Inoltre numerose mutazioni del gene GAA sono state riportate senza evidenza di una chiara correlazione fenotipo-genotipo. Obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare il profilo genico nel muscolo scheletrico in pazienti affetti da GSD II con variabile aspetto morfologico muscolare. Abbiamo pertanto analizzato 10 biopsie muscolari di pazienti con GSD II e 5 controlli, dividendoli in 2 gruppi: gruppo 1 (G1) caratterizzato da miopatia vacuolare con marcato aumento di glicogeno; gruppo 2 (G2) biopsie con minime alterazioni morfologiche e senza accumulo di glicogeno. L'RNA muscolare estratto è stato ibridizzato su un pannello di GeneChip contenente l'intero genoma umano con approssimativamente 44000 geni ed i dati ottenuti sono stati analizzati mediante un sistema software GeneSpring 7.3. I risultati hanno mostrato che circa 2000 geni erano “overespressi” in G1 rispetto a G2: alcuni di questi geni risultavano coinvolti nel processo autofagico, altri erano dei trascritti di proteine leganti il calcio ed altri ancora erano geni coinvolti nei processi di traduzione e degradazione delle proteine. Tali differenze di espressione genica, riscontrate tra i due gruppi, supportano l'ipotesi che fattori genetici aggiuntivi abbiano un ruolo rilevante nella patogenesi della GSD II.

Differente espressione di mastociti triptasi-positivi nelle miopatie infiammatorie

Ali G*, Ricci G[^], Boldrini L*, Servadio A*, Andreoni S*, Corsi V*, Caldarazzo E[^], Pieri F^o, Siciliano G[^], Fontanini G*

**Dipartimento di Chirurgia, [^]Dipartimento di Neuroscienze, ^oDipartimento di Neurochirurgia, Pisa, Italia*

I mastociti sono cellule effettrici del sistema immunitario innato, il cui ruolo nei meccanismi eziopatogenetici delle malattie allergiche ed autoimmunitarie è ben documentato. Precedenti studi hanno dimostrato come i mastociti possano influenzare significativamente la risposta infiammatoria ed immunitaria attraverso vari meccanismi, in gran parte ancora sconosciuti, con effetti pro- e anti-infiammatori. I mastociti umani vengono classicamente distinti in due differenti popolazioni (chinasasi positivi e triptasi positivi), sulla base dei differenti tipi e quantità di enzimi espressi. L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare un possibile coinvolgimento dei mastociti nell'ambito delle miopatie infiammatorie. Abbiamo analizzato, con immunoistochimica su biopsia muscolare, l'espressione di mastociti triptasi-positivi in tre differenti affezioni muscolari di natura infiammatoria: in particolare in quattro casi di miosite aspecifica, quattro di miosite a corpi inclusi (MCI) e tre di polimiosite (PM). La colorazione immunoistochimica per la triptasi è apparsa chiaramente visibile nell'endo- e perimisio sia come depositi di colore marrone all'interno di mastociti integri sia come materiale granulare in sede extracellulare. Il numero dei mastociti nelle miositi aspecifiche è risultato significativamente minore in confronto a quello riscontrato sia nelle MCI ($P = 0.01$) che nelle PM ($P = 0.007$). I nostri risultati, seppur preliminari e su una ristretta casistica, sembrano pertanto individuare un possibile ruolo dei mastociti nella patogenesi delle MCI e delle PM.

Studio immunoistochimico della distribuzione di p-tau, APP e $\alpha\beta$ -cristallina in 44 casi di miopatie vacuolari con differente eziologia

Anatrone C, Zotta M, Vittonatto E, Chiadò-Piat L, Gai G, Vercelli L, Palmucci L, Mongini T
Centro per le Malattie Neuromuscolari, Dipartimento di Neuroscienze, Torino, Italia

Le miopatie a corpi inclusi, sporadiche e ereditarie, sono caratterizzate da accumulo tessutale di una serie di proteine correlate ai processi degenerativi tipici delle demenze e di altre malattie del sistema nervoso centrale, tra cui beta amiloide, tau fosforilata, e un'altra ventina di proteine più o meno specifiche. L'esatto meccanismo che innesci la cascata patologica in queste miopatie non è ancora noto, e si discute se essa costituisca un evento precoce o solo un epifenomeno della malattia nelle sue varie forme. Abbiamo studiato 44 biopsie muscolari caratterizzate dalla presenza di vacuoli intracitoplasmatici con differente eziologia, per valutare la specificità degli anticorpi anti p-tau, APP e $\alpha\beta$ -cristallina, e quindi la loro possibile utilità nello studio delle biopsie muscolari. In particolare, sono stati selezionati 18 casi di miopatie vacuolari infiammatorie, 11 miopatie degenerative, 10 distrofie oculo-faringee (OPMD), 3 SLA, due casi di miopatie metaboliche (deficit di

maltasi acida, miopatia da accumulo lipidico). Inoltre sono stati studiati 6 casi di distrofia muscolare con difetto noto (distrofinopatie, deficit di alfa-sarcoglicano, disferlina, calpaina e FKRP) e 5 controlli normali. I marcatori sono risultati completamente negativi in tutti i casi di DMP nota, nelle miopatie metaboliche e nella SLA; nella OPMD si è osservata una alta positività per la sola $\alpha\beta$ -cristallina (90%); nel 38% delle miopatie vacuolari infiammatorie e nel 45% di quelle degenerative è stata rilevata forte positività per tutti e tre gli anticorpi. Questi marcatori sembrano quindi essere relativamente specifici nella diagnosi differenziale delle miopatie vacuolari, ma devono essere valutati in stretta correlazione con i dati clinici, istologici e eventualmente con l'esame ultrastrutturale.

Riduzione delle ospedalizzazioni per infezione del tratto respiratorio nei malati neuromuscolari "ventilatore-dipendenti"

Arcaro G°, Braccioni F°, Gallan F°, Marchi R°, Donà A°, Chizzolini M°, Chizio S°, Gallina G*, Vianello A°

°U.O. Fisiopatologia Respiratoria – Azienda Ospedale-Università di Padova; * UILDMD sez. Padova, Italia

Le infezioni del tratto respiratorio (ITR) con ingombro bronchiale rappresentano una frequente causa di ospedalizzazione per i Malati Neuro-Muscolari (MNM) sottoposti a Ventilazione Meccanica Domiciliare (VMD). Abbiamo pertanto predisposto un protocollo di trattamento domiciliare delle ITR e ne abbiamo verificato l'efficacia nel ridurre l'ospedalizzazione dei MNM "ventilatore-dipendenti". Sono stati inclusi nello studio MNM sottoposti a VMD che presentassero ITR con ingombro bronchiale; essi sono stati casualmente assegnati al protocollo di trattamento (gruppo A) o al trattamento convenzionale (gruppo B). Il protocollo sperimentale prevede: 1) applicazione continua della ventilazione non-invasiva 24ore/die; 2) assistenza manuale e meccanica alla tosse; 3) monitoraggio polsossimetrico.

	Gruppo A	Gruppo B	p
Età (aa)	35.1±6	29.2±7	n.s.
Ospedalizzazioni (n)	0	11	<0.05
Intubazione (n)	0	3	n.s.
Tracheotomia (n)	0	3	n.s.
Accesso al PS (n)	0	3	n.s.
Decesso (n)	0	0	-

End-point primario è stato definito il numero di ospedalizzazioni; sono stati inoltre considerati la necessità di intubazione e tracheotomia, gli accessi al Pronto Soccorso e la mortalità. La durata dello studio è stata di 18 mesi. Sono stati inclusi 10 MNM nel gruppo A e 10 nel gruppo B. Il confronto tra i due gruppi viene riportato nella tabella. In conclusione, l'utilizzo del protocollo di trattamento domiciliare basato sulla ventilazione non-invasiva continua e sull'assistenza

alla tosse consente di ridurre le ospedalizzazioni dei MNM, che presentino infezione del tratto respiratorio.

Miopia a corpi riducenti: studio clinico e di imaging muscolare

Astrea G^{*^}, Battini R^{*}, Tosetti M^{*}, Minetti C[°], Muntoni F^{**}, Schessl J^{^^}, Cioni G^{*^}

Dip. di Neuroscienze dello Sviluppo, IRCCS Stella Maris, [^]Div. di Neuropsichiatria Infantile, Università di Pisa, [°]Unità Complessa Malattie Muscolari e Neurodegenerative, Università di Genova, ^{**}Imperial College London Institute of Reproductive & Developmental Biology, Hammersmith Hospital, ^{^^}Division of Neurology, University of Pennsylvania.

La miopia congenita a corpi riducenti (RBM) è una rara patologia caratterizzata da progressivo deficit neuromuscolare il cui difetto genico è stato identificato solo recentemente (Schessl J et al. JCI 2008). Scopo dello studio: verificare l'importanza della Risonanza Magnetica Muscolare nella patologia oggetto di studio e confermare l'utilizzo di tale tecnica nell'iter diagnostico dei disturbi neuromuscolari. Case report: ragazzo di 19 anni la cui storia clinica inizia a 7 anni con: rigidità del rachide, progressivamente aggravatasi, deficit di forza, retrazioni tendinee prevalenti ai gomiti ed ai polsi. A 13 anni: perdita della deambulazione autonoma, peggioramento delle retrazioni tendinee che diventano diffuse e comparsa di scoliosi. A 17 anni il paziente necessita di assistenza ventilatoria continua notturna. I valori di CK hanno sempre oscillato tra 1500-2000 U/L; la biopsia muscolare documentava alterazioni di tipo miopatico, senza aree di necrosi, con presenza di numerose fibre rotondeggianti di vario calibro includenti corpuscoli di forma irregolare. La Risonanza Magnetica Muscolare (GE System Advantage Signa 1.5, Milwaukee, Win., USA): sequenze T1 assiali, spin echo utilizzando un FOV variabile da 28 a 35 cm) della coscia e della gamba ha mostrato un pattern di compromissione dei muscoli della loggia posteriore della coscia (prevalente interessamento dei muscoli adduttore magno, semi-membranoso e bicipite femorale), ma non di gracile, sartorio e quadricipite femorale. Tale pattern pur con segni minori di compromissione veniva riscontrato nella madre (34 anni), ma non nel padre (40anni), entrambi apparentemente asintomatici. Il quadro clinico aspecifico del ragazzo poteva far sospettare una miopia di Bethlem, ma l'imaging mostra caratteristiche diverse da quelle descritte (Mercuri et al 2002). La positività dell'imaging materno ha fatto ipotizzare un'ereditarietà X-linked confermata poi dalle indagini genetiche. Il probando mostra una mutazione del gene FHL1 in omozigosi (c.457T>C/p.C153R), di cui la madre è portatrice.

Distrofia muscolare dei cingoli con alterazioni della sostanza bianca in tre pazienti con mutazioni del gene LAMA2

Bello L^{*}, Gavassini BF^{*}, Carboni N[^], Maioli MA[^], Marrosu G[^], Ticca AF[^], Mura M[^], Marrosu MG[^], Cao M^{*}, Angelini C^{*}, Pegoraro E^{*}

^{*}Centro Neuromuscolare, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Padova, [^]Dipartimento di Cardiologia e Scienze Neurologiche, Università di Cagliari, Italia

Mutazioni nel gene LAMA2, che codifica per la catena pesante della laminina alfa-2 (merosina), sono causa di distrofia muscolare congenita associata ad alterazioni di segnale della sostanza bianca in RMN, con espressione clinica variabile da mite a severa. Riportiamo qui i casi di tre pazienti, appartenenti a due famiglie non correlate, con mutazioni nel gene LAMA2 e fenotipo compatibile con distrofia muscolare dei cingoli. L'esordio della debolezza muscolare risale all'età pediatrica o giovanile-adulta dopo normale sviluppo psicomotorio. Tutti i pazienti sono ancora deambulanti ad età comprese fra 17 e 47 anni. Tutti hanno presentato episodi critici (crisi epilettiche tonico-cloniche e parziali o episodi di perdita di coscienza con alterazioni all'EEG) e la RMN cerebrale ha mostrato alterazioni della sostanza bianca. La biopsia muscolare, compatibile con miopia o distrofia muscolare, mostrava in ogni caso una lieve ed omogenea riduzione dell'immunoreazione per la laminina alfa-2. L'analisi molecolare del gene LAMA2 ha portato all'identificazione di mutazioni causative nei tre pazienti. Questi pazienti espandono lo spettro fenotipico associato alle mutazioni del gene LAMA2, che include forme congenite con o senza alterazioni strutturali del SNC e forme cingolari, come già riportato nei difetti di glicosilazione dell'alfa-distroglicano.

Disturbi del sonno e malattie muscolari

Bonanni E, Faloni M, Cignoni F, Di Coscio E, Maestri M

Dipartimento di Neuroscienze, Università di Pisa, Italia

I disturbi del sonno sono estremamente frequenti nelle patologie neuromuscolari. Le modificazioni fisiologiche del respiro durante il sonno, quali la scomparsa del controllo volontario, il progressivo decremento della risposta ventilatoria allo stimolo chimico, la riduzione del tono dei muscoli dilatatori delle vie aeree superiori fanno sì che il sonno possa rappresentare un test da sforzo per la funzione respiratoria. Infatti il disturbo del respiro durante il sonno può comparire prima che si instauri un quadro di insufficienza respiratoria durante la veglia ed è caratterizzato da un pattern respiratorio complesso con presenza di apnee centrali, periferiche ed ipoventilazione in sonno REM. Oltre al disturbo respiratorio sono frequenti altri tipi di disturbi del sonno quali mioclono periodico, insonnia e un quadro di eccessiva sonnolenza diurna simile alla narcolessia, descritto in pazienti con distrofia miotonica di Steinert. La valutazione clinica e poligrafica dei disturbi del sonno è quindi estremamente utile in questi pazienti e può fornire strumenti per migliorare la qualità di vita e la prognosi in queste malattie.

Valutazione clinico-strumentale della disfagia nelle malattie neuromuscolari

Bongioanni P

U.O. Neuroriabilitazione, Dip. Neuroscienze – Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Italia

Non infrequentemente i malati neuromuscolari lamentano difficoltà masticatorie e deglutitorie. Il quadro clinico è quello di una disfagia oro-faringea prevalentemente per i liquidi, ingenerata da ipostenia/paralisi muscolare primitivamente miogena o conseguente a danno del I e/o del II motoneurone tronco-encefalico. Se non trattata efficacemente la disfagia comporta perdita di peso e malnutrizione, nonché aspirazione di cibo nelle vie aeree con il rischio di complicazioni broncopulmonari. La valutazione funzionale della gravità della disfagia necessariamente accompagna il momento diagnostico nosografico e precede il trattamento riabilitativo. Essa comporta l'esame fisico delle strutture addette alla deglutizione (apprezzando forza e tono dei muscoli della faccia, della bocca, della lingua e dell'oro-faringe); lo studio clinico dell'atto deglutitorio (ricercando ispettivamente eventuali ristagni di cibo sul palato, sotto la lingua e nei solchi buccali; osservando se vi è fuoriuscita di liquidi o cibo dalla bocca; controllando l'elevazione dell'osso ioide e della cartilagine tiroidea; annotando la presenza di tosse e/o di sensazione di soffocamento; testando direttamente la performance deglutitoria) con la compilazione delle relative scale clinimetriche (Swallowing Rating Scale; Dysphagia Severity Scores; Dysphagia Outcome & Severity Scale); l'effettuazione di esami strumentali (come la videofluoroscopia, la fibroscopia, la scintigrafia del transito oro-faringo-esofageo). Se la videofluoroscopia rappresenta il golden standard per la diagnostica funzionale della disfagia, senza dubbio solo la scintigrafia del transito oro-faringo-esofageo consente una quantificazione del deficit deglutitorio con buona specificità e riproducibilità, nonché tra l'altro una precoce individuazione di un'iniziale lieve disfagia.

Un microarray per ibridazione genomica comparativa ad alta densità (HD-CGH) come strumento per identificare mutazioni introniche profonde nel gene distrofina

Bovolenta M*, Fini S*, Neri M*, Fabris M*, Martoni E*, Bassi E*, Spitali P*, Falzarano S*, Trabanelli C*, Venturoli A*, Ashton E[^], Abbs S[^], Muntoni F[°], Rimessi P*, Gualandi F*, Ferlini A*

*Università di Ferrara, Sezione di Genetica Medica, Ferrara, Italia; [^]Guy's Hospital, Genetics Centre, Londra, Regno Unito; [°]UCL Institute of Child Health, Dubowitz Neuromuscular Centre, Londra, Regno Unito

Mutazioni nel gene distrofina sono causa delle distrofie muscolari di Duchenne (DMD) e Becker (BMD). Con le metodiche molecolari utilizzate di routine, è possibile identificare il 95-98% delle mutazioni causative, rappresentate da delezioni/duplicazioni esoniche (78% dei casi) e mutazioni puntiformi (15-20% dei casi). Nel

restante 2-5% dei pazienti DMD/BMD sono probabilmente presenti riarrangiamenti puramente intronici. Per esplorarne l'occorrenza abbiamo disegnato un array DMD HD-CGH, selezionando le sonde per CGH, presenti nel database Agilent, disegnate nella regione cromosomica chrX:30947266-33367647 (NCBI Build 36.1, hg18) che comprende 2,2 Mb del gene distrofina e 100 kb a monte e a valle del gene stesso. La densità dell'array è di circa una sonda (60-mer) ogni 260 bp. Il formato finale 4x44k è stato raggiunto reiterando le sonde al fine di ottenere replicati sperimentali in diverse posizioni dell'array. L'array DMD HD-CGH è stato preliminarmente testato in 4 di 12 pazienti DMD risultati negativi per mutazioni esoniche. In due soggetti abbiamo identificato rispettivamente una delezione di 3 kb nell'introne 2 e due delezioni non contigue negli introni 44 (83 kb) e 45 (4 kb) non riportate nel Database delle Varianti Genomiche. Nell'ultimo caso, l'array ha consentito di mappare finemente i breakpoint intronici di un'inversione dell'esone 45 e di parte degli introni fiancheggianti causante la non incorporazione dell'esone stesso nel trascritto distrofina. E' in corso l'analisi degli 8 pazienti restanti. Tutti i riarrangiamenti individuati saranno validati tramite Real Time PCR. Inoltre, lo studio del profilo trascrizionale su muscolo scheletrico consentirà di chiarire il significato patogenetico delle mutazioni identificate.

L'iposializzazione della neprilisina altera la sua espressione ed attività enzimatica nella miopatia ereditaria a corpi inclusi

Broccolini A*, Gidaro T*, De Cristofaro R[^], Morosetti R*, Gliubizzi C*, Ricci E*, Tonali PA*, Mirabella M*

*Dipartimento di Neuroscienze e [^]Dipartimento di Medicina Interna, Università Cattolica, Roma

La miopatia ereditaria a corpi inclusi autosomica recessiva (HIBM) è causata da mutazioni del gene UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasi/N-acetilmanno-samina chinasi (GNE), un enzima implicato nella sintesi dell'acido sialico. Il muscolo HIBM è caratterizzato da un'alterata sializzazione delle glicoproteine e da un anormale accumulo di proteine tra cui l'amiloide β (A β). La neprilisina (NEP), una metalloproteinasi in grado di clivare la A β , presenta numerosi siti di N-glicosilazione. Precedenti studi hanno evidenziato che un'alterazione a carico delle catene glucidiche della NEP compromette la sua attività enzimatica. In questo studio abbiamo dimostrato che nel muscolo HIBM la NEP è iposializzata e la sua espressione ed attività enzimatica sono ridotte rispetto a controlli normali. In miotubi in coltura la rimozione sperimentale dell'acido sialico dalle glicoproteine, mediante trattamento con neuroaminidasi, compromette la stabilità della NEP risultando quindi in una riduzione del suo livello di espressione ed attività enzimatica. Il trattamento con la neuroaminidasi si associa ad un'aumentata immunità per la A β sotto forma di distinti foci citoplasmatici all'interno dei miotubi. Ipotizziamo quindi che nel

muscolo HIBM l'ipossilizzazione della NEP risulta in un'alterazione dei meccanismi di clearing della A β , contribuendo così al suo anormale accumulo all'interno delle fibre muscolari e favorendone la degenerazione.

Un secondo caso di MNGIE senza il tipico coinvolgimento mitocondriale muscolare

Cardaioli E*, Da Pozzo P*, Malfatti E*, Battisti C*, Gallus GN*, Gambelli S*, Gaudiano C*, Macucci M[^], Malandrini A*, Margollicci MA^o, Rubegni A*, Dotti MT*, Federico A*

*Dipartimento di Scienze Neurologiche e del Comportamento, Università degli studi di Siena; [^]U.O. Neurologia, Ospedale S. Giuseppe, Empoli (Firenze);

^oDipartimento di Pediatria, Medicina Ostetrica e Riproduttiva, Università degli studi di Siena, Italia

L'Encefalomiopatia Mitocondriale Neuro-Gastro-Intestinale (MNGIE) è una rara malattia multi-sistemica autosomica recessiva ad evoluzione infausta, caratterizzata dall'associazione di oftalmoplegia cronica progressiva, neuropatia periferica, alterazioni della sostanza bianca cerebrale e disturbi gastrointestinali. Compare in genere tra i 10 e i 40 anni, ma nel 60% circa dei pazienti insorge prima dei 20 anni d'età. La malattia è causata da mutazioni nel gene per la timidina fosforilasi (TP), determinandone la perdita di funzione. La conferma molecolare è stata riportata in meno di 100 pazienti. Le biopsie muscolari tipicamente mostrano evidenze morfologiche e biochimiche di disfunzione mitocondriale. L'analisi del mtDNA su muscolo ed altri tessuti ha evidenziato la presenza di delezioni, deplezione e mutazioni puntiformi nella maggioranza dei casi MNGIE. Scopo: identificare alterazioni del mtDNA e mutazioni patogene sul gene TP in un paziente MNGIE, che presentava accumuli di glicogeno e di lipidi nella biopsia muscolare, nella quale erano assenti alterazioni tipiche del metabolismo mitocondriale (RRF e fibre COX negative). Venivano effettuati Southern blot, PCR semiquantitativa ed analisi di sequenza alla ricerca di macroriparangiamenti, deplezione e mutazioni puntiformi del mtDNA. Inoltre venivano amplificati e sequenziati tutti gli esoni e le giunzioni introniche del gene TP. Southern blot ed analisi semiquantitativa del mtDNA erano negativi. Nel mtDNA non erano presenti mutazioni patogene. L'analisi di sequenza del gene TP evidenziava la presenza di una mutazione G→C in omozigosi al sito accettore dello splicing del primo introne (IVS1-1G>C). In conclusione, la mutazione IVS1-1G>C era stata precedentemente descritta solo in un altro caso MNGIE. Anche quel paziente mostrava accumuli di glicogeno ed assenza di tipiche alterazioni mitocondriali. Ciò suggerisce una stretta correlazione genotipo-fenotipo.

Rippling Muscle Disease (RMD) e CardioMiopatia Dilatativa (CMD) associate a mutazione nel gene della caveolina3

Catteruccia M*, Sanna T*, Lo Monaco M*, Di Giacomo R*, Antorelli FM[^], Servidei S*

*Università Cattolica e [^]Ospedale Bambino Gesù, Roma, Italia

Ripportiamo un uomo di 50 anni giunto all'osservazione medica per dolore toracico, disturbi di conduzione cardiaca ed iperCKemia. L'esame neurologico evidenzia ipertrofia muscolare diffusa e fenomeni di rippling e di mounding alla percussione. I due figli presentano iperCKemia, ipertrofia muscolare e RMD. Alla RM muscolare si osserva infiltrazione adiposa marcata e selettiva di alcuni muscoli degli arti inferiori. L'ecocardiogramma e la RM cardiaca evidenziano aspetti indicativi di CMD. La biopsia muscolare mostra alterazioni miopatiche e netta riduzione della caveolina. L'analisi genetica dimostra la presenza in eterozigosi della mutazione p.Ala45Val nel gene CAV3, identificata da Betz nel 2001 nella famiglia con RMD originariamente descritta da Ricker et al. (1989). Le mutazioni nel gene CAV3 si possono associare a malattie muscolari (LGMD-1C, RMD, iperCKemia e miopatia distale) o cardiache (Cardiomiopatia Ipertrofica Familiare e Sindrome del QT lungo). La stessa mutazione può determinare fenotipi diversi ma è ritenuto che miopatia e cardiomiopatia non coesistano. Tuttavia: a) il nostro paziente ha sia RMD che CMD/ aritmogena b) Traverso et al. (2008) hanno riportato un caso con CMD e miopatia c) nella famiglia di Ricker due membri con RMD morivano di morte improvvisa d) nei modelli animali miopatia e cardiomiopatia coesistono. Riteniamo quindi che il coinvolgimento cardiaco nelle malattie muscolari da CAV3 sia sottostimato e potenzialmente fatale. Una più accurata valutazione cardiologica è pertanto necessaria in queste patologie.

Eterogeneità fenotipica associata alla mutazione A8344G-MERRF del DNA mitocondriale

Catteruccia M, Sauchelli D, DellaMarca G, Minicuci G, Di Giacomo R, Vollono C, Servidei S

Università Cattolica, Roma, Italia

Abbiamo studiato 15 pazienti appartenenti a 7 famiglie. Solo 4/15 hanno il fenotipo MERRF (Mioclono, Epilessia, RRF) (27%); gli altri presentano: intolleranza allo sforzo ed anomalie EEG parossistiche (4), miopatia pura (5), epilessia (1), sindrome di Leigh (1). Dall'analisi della ricorrenza delle singole manifestazioni cliniche i sintomi "periferici" sono i più frequenti: il 60% dei pazienti manifesta intolleranza allo sforzo, e il 47% debolezza muscolare e/o polineuropatia; mioclono, epilessia, deterioramento cognitivo e atassia si riscontrano invece rispettivamente nel 33, 33, 20 e 13% dei casi. Grave acidosi lattica è presente in 9/15. In quattro era necessario il supporto respiratorio notturno. La percentuale di genomi mutati appare piuttosto omogenea, dal 75 all'88% nel muscolo e dal 60 all'80 % nel sangue, e non correla né con il fenotipo clinico, né con il fenotipo morfologico/biochimico. La RMN

cranio evidenza atrofia cerebrale e/o cerebellare in 4 pazienti con moderato deterioramento cognitivo, e lesioni corticali reversibili in una paziente. La RM spettroscopica mostra un'inversione del rapporto Colina/Creatina e una riduzione della NAA, ma mai aumento del lattato. La RMN muscolare suggerisce un caratteristico pattern di progressione ed interessamento dei vari gruppi muscolari con atrofia e sostituzione fibro-adiposa senza segni di edema. Nel confronto con 29 pazienti con mutazione "MELAS", la MERRF sembra avere un decorso con deficit motori e cognitivi meno invalidanti, ma una prognosi quoad vitam globalmente più grave (morte prematura in 4/15 MERRF contro 3/29 MELAS).

Efficacia di un trattamento riabilitativo motorio e respiratorio nella distrofia tipo facio-scapolo-omerale

Chisari C, Dalise S, Rossi B

U.O. *Neuroriabilitazione, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Pisa, Italia*

In questo studio abbiamo valutato l'efficacia di un periodo di trattamento riabilitativo, comprensivo di training su tapis roulant e di specifici esercizi per il rinforzo dei muscoli respiratori. Abbiamo seguito 7 pazienti affetti da distrofia tipo facio-scapolo-omerale (FSO) durante un periodo di 6 mesi. 5 hanno svolto il programma riabilitativo e 2, non trattati, sono stati i nostri controlli. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a test funzionali all'inizio e alla fine del follow-up: 1) Test da sforzo con dosaggio della CPK pre e post esercizio; 2) Scala MRC; 3) Spirometria, MIP, MEP ed Emogasanalisi; 4) Scale motorie funzionali. Per tre pazienti il protocollo riabilitativo consisteva in sedute di fisiochinesiterapia passiva ed attiva-assistita, ed allenamento specifico individuale su tapis roulant; due pazienti hanno svolto lo stesso programma associato ad un training specifico di rinforzo per i muscoli respiratori. Il trattamento prevedeva 3 sedute settimanali ed ogni sessione durava da 60' a 90'. Tutti i pazienti trattati hanno riferito una migliore autonomia nelle attività di vita quotidiana. Obiettivamente, abbiamo registrato un miglioramento della funzionalità muscolare con aumento della durata e della velocità massima al test da sforzo, con una migliore compliance cardiovascolare. I parametri funzionali respiratori sono migliorati in tutti i pazienti trattati, specie nel gruppo con esercizi specifici. Questo studio preliminare ha evidenziato che il trattamento riabilitativo disegnato individualmente, sulla base di valutazioni funzionali obiettive, può essere efficace nella "gestione" a lungo termine di soggetti FSO.

Cardiomiopatia dilatativa in un caso di distrofia muscolare dei cingoli di tipo 2K

Codemo V, Pezzani R, Bello L, Melacini P, Cao M, Angelini C, Pegoraro E

Centro per le malattie Neuromuscolari, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Padova, Italia

Mutazioni del gene POMT1 (O-mannosil-transferasi-1) causano un ampio gruppo di distrofie muscolari autosomali recessive con fenotipo clinico variabile da forme di distrofia muscolare congenita associata ad anomalie della migrazione neuronale a forme di distrofia muscolare dei cingoli lieve con ritardo mentale (LGMD2K). Riportiamo il caso di un ragazzo di 20 anni con una distrofia muscolare dei cingoli di grado lieve ed una grave cardiomiopatia dilatativa. La diagnosi di distrofia muscolare è stata fatta all'età di 3 anni sulla base di un riscontro occasionale di elevati livelli di CPK (~10000 U/L), e di una biopsia muscolare compatibile con miopatia evolutiva. All'età di 8 anni veniva diagnosticata una cardiomiopatia dilatativa con ipocinesia ventricolare sinistra ad andamento evolutiva. Per la comparsa di astenia e dispnea, all'età di 18 anni il paziente intraprendeva terapia con beta-bloccanti e acinibitori con beneficio clinico. L'esame neurologico all'età di 20 anni mostrava lieve ipostenia della muscolatura prossimale degli arti superiori e inferiori, scapola alata, ipotrofia del cingolo scapolare e ipertrofia della muscolatura degli arti inferiori. Il profilo neuropsicologico risultava nella norma. Studi di immunoistochimica per l'alfa-distroglicano (epitopo glicosilato) su muscolo mostravano una reazione severamente ridotta. L'analisi molecolare del gene POMT1 ha portato all'identificazione di mutazioni patogenetiche in entrambi gli alleli. Questo caso amplia lo spettro clinico associato a mutazioni del gene POMT1, includendo anche la cardio-miopia.

Espressione fenotipica differente in individui eterozigoti ed omozigoti appartenenti ad una famiglia con nuova mutazione di miotonia congenita

Contardi S°, Bulli C*, Di Stasi V°, Sangiuolo F*, Montagna P°, Novelli G*, Liguori R°

*°Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Bologna; *Dipartimento di Biopatologia e Diagnostica per Immagini, Università di Tor Vergata, Roma, Italia*

La miotonia congenita (MC) è una malattia genetica neuromuscolare caratterizzata da difficoltà nel rilasciare la contrazione muscolare volontaria, dovuta ad una mutazione sul gene CLCN1 per il canale del cloro nel muscolo scheletrico. Esistono 2 varianti di MC: miotonia di Becker, una miotonia generalizzata autosomica recessiva, e miotonia di Thomsen, una miotonia più lieve autosomica dominante o raramente recessiva. Nel nostro studio descriviamo le caratteristiche cliniche ed elettrofisiologiche di una famiglia con una nuova mutazione del gene CLCN1, responsabile di MC. Il probando è una ragazza di 19 anni che lamenta fin dall'infanzia rigidità muscolare improvvisa e debolezza agli arti inferiori all'inizio di un movimento, con occasionali cadute a terra. Da 2 anni riferisce anche difficoltà nella decontrazione dei muscoli

segmentali e mimici. La rigidità muscolare migliora con l'esercizio fisico e non è peggiorata dall'esposizione alle basse temperature. I genitori sono cugini di primo grado. La madre non presenta segni o sintomi suggestivi di una malattia neuromuscolare. Il padre riferisce crampi muscolari ai polpacci fin dall'adolescenza. Inoltre, una zia, sorella del padre, lamenta rigidità muscolare e crampi ai polpacci, esorditi in età infantile. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame obiettivo neurologico, elettromiografia con test del raffreddamento e dell'ischemia, analisi genetica per MC. Abbiamo infine eseguito biopsia muscolare sul probando. La clinica e le valutazioni elettromiografiche hanno mostrato espressione variabile della malattia: assenza di segni o sintomi (madre), solo sintomi (padre), sintomi ed alterazioni strumentali (probando e zia). La biopsia muscolare del probando ha evidenziato segni miopatici. L'analisi genetica ha confermato la presenza di miotonia congenita, con il rilevamento di una nuova mutazione F468S a carico del gene CLCN1. La mutazione è espressa in omozigosi nel probando e in eterozigosi negli altri membri del nucleo familiare. In letteratura sono segnalate circa 80 mutazioni a carico del gene CLCN1, alcune delle quali determinano una variabilità fenotipica all'interno della stessa famiglia, soprattutto tra gli eterozigoti. Con il nostro studio confermiamo questo dato e segnaliamo una nuova mutazione da ricercare nel sospetto di MC.

Alterazione delle abilità visuo-spaziali in pazienti affetti da distrofia miotonica di Steinert

Contardi S, Gallassi R, Pizza F, Oppi F, Poda R, Liguori R

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Bologna, Italia

La Distrofia Miotonica di tipo I (DM1) è una malattia genetica autosomica dominante multisistemica dovuta ad un'anomala ripetizione di una tripletta CTG del gene DMPK localizzato sul cromosoma 19. Sono stati segnalati differenti disturbi cognitivi: difficoltà di apprendimento, deficit di attenzione, deficit di espressione verbale, problemi di memoria, ritardo mentale conclamato. Obiettivo del nostro studio è la valutazione dell'abilità visuo-spaziali nei pazienti affetti da DM1 in una popolazione di pazienti affetti da DM1 afferenti al Centro per lo Studio delle Malattie Neuromuscolari della Clinica Neurologica dell'Università di Bologna. I pazienti appartenevano a diverse classi di gravità di malattia, espressa in termini di numero di triplette espanse sul cromosoma 19: E1, forma lieve, E2, forma intermedia, E3, forma grave. I pazienti sono stati sottoposti a valutazione neuropsicologica volta a studiare l'abilità cognitiva globale, in termini di quoziente intellettivo totale (QI), scomposto nelle 2 componenti del QI verbale (VQI) e del QI di performance (PQI), con i relativi subscores (scala d'intelligenza per adulti Wechsler Revised, WAIS-R). I risultati ottenuti sono stati analizzati in funzione della classe genetica di appartenenza e della durata di malattia, intesa come

esordio del primo sintomo riferito dal paziente. La nostra popolazione era composta da 26 pazienti affetti da DM1, età media 37.92 ± 13.99 (range 17-71), appartenenti a diverse classi genetiche di malattia: 6 E1, 14 E2, 6 E3. IL QI medio era 87.31 ± 19.86 (range 50-124), con valori lievemente superiori per il VQI rispetto al PQI (89.35 ± 18.73 , range 56-123, vs 87.19 ± 19.56 , range 53-122). Solo 4 pazienti, appartenenti alla classe E3, presentavano un QI inferiore a 70, ritenuto cut-off per la diagnosi di ritardo mentale. Confrontando i valori del QI in funzione della classe di malattia, è emersa una correlazione lineare con il numero di espansioni CTG, soprattutto per quanto riguarda il VQI. Per la durata di malattia, tutti i pazienti riferivano come sintomo d'esordio la miotonia. Valori medi di durata di malattia erano 17.31 ± 14.08 anni, range 2-59. Confrontando i valori del QI in funzione di tale parametro, emergeva una correlazione lineare solo con il PQI, in particolare con i subscores inerenti le abilità visuo-spaziali (riordinamento di storie, disegno con cubi, ricostruzione di oggetti, associazione di simboli), all'interno della classe E1 con il PQI. I risultati confermano dati di letteratura, sottolineando un peggioramento globale delle prestazioni cognitive dei pazienti affetti da DM1 all'aumentare del numero di espansioni di triplette CTG, con ritardo mentale conclamato solo nei pazienti E3. L'ulteriore analisi del QI in funzione della durata di malattia evidenzia un chiaro effetto della durata solo sul PQI, quindi sulle abilità visuo-spaziali. In particolare, per quanto riguarda i pazienti di classe E1 che globalmente presentano un QI normale, è emerso un coinvolgimento delle abilità visuo-spaziali di gravità variabile in funzione della durata di malattia.

Rischio aritmico nella Distrofia miotonica tipo 1: ruolo delle variabili cliniche e genetiche

Cudia P*, Bernasconi P*, Chiodel R[^], Martini A^o, Canioni E*, Romaggi S*, Ferrari G*, Moranti L*

On behalf of the RAMYD study group

**Muscular Pathology and Neuroimmunology Unit, IRCCS Foundation Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano, ^Arrhythmology Unit, Istituto Cardiologico "Monzino", Milano °Research and Clinical Development Service, IRCCS Found. Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano, Italy*

Le aritmie cardiache rappresentano una delle più gravi complicanze nella distrofia miotonica di tipo I (DM1), essendo una delle principali cause di morte improvvisa. I fattori di rischio aritmogeno nella DM1 sono tuttora poco definiti. Scopo del presente studio è quello di valutare la correlazione tra rischio aritmogeno e variabili cliniche (sesso, età, gravità della compromissione muscolare, familiarità per cardiopatia) e genetiche (numero di triplette CTG). 245 pazienti con diagnosi geneticamente confermata di DM1 hanno effettuato una valutazione cardiologica non invasiva completa. La severità della compromissione muscolare è stata valutata mediante il muscular disability score (MDRS). Fra i 245 pazienti, 63 hanno sviluppato

aritmie cardiache. In 40 pazienti è stato effettuato l'impianto di un device. Sei pazienti sono deceduti per morte cardiaca improvvisa. E' stata rilevata una correlazione statisticamente significativa tra presenza di aritmia e sesso, età, classe di espansione, MDRS. Nessuna relazione è stata rilevata tra aritmia e familiarità per cardiopatia. L'analisi statistica di regressione logistica multivariata ha mostrato che i più importanti fattori predittivi del rischio aritmogeno sono sesso ed MDRS. In conclusione il nostro studio ha dimostrato che il rischio aritmico nella DM1 è più elevato nei maschi e nei soggetti con maggiore severità clinica ($MDRS \geq 3$).

La valutazione pneumologica in pazienti affetti da distrofia miotonica di Steinert (DM1): test diagnostici e predittivi

Culla G*, Mangiola F*, Sciarpa F*, Modoni A[^], Maciullo M[^], Ricci E*, Silvestri G[^]

*UILDM-Sez. Laziale, Roma, [^]Dip. Di Neuroscienze-Università Cattolica S.Cuore, Roma, Italia

Alterazioni della ventilazione durante il sonno e apnee ostruttive sono frequenti nei pazienti affetti da DM1. Precedenti studi non hanno documentato correlazioni significative tra parametri di funzionalità respiratoria e desaturazioni notturne, successivamente ricondotte al concomitante coinvolgimento del SNC. Abbiamo selezionato 49 pazienti DM1 con sospetto clinico di alterazioni respiratorie durante il sonno, che hanno effettuato una pulsossimetria notturna. È stata eseguita la misura dei volumi polmonari statici e dinamici, dell'MVV e delle P max.: 18 pazienti (37%) non sono stati in grado di effettuare i test in modo soddisfacente. Nei restanti 31 i valori spirometrici sono stati correlati mediante test di Spearman con tre parametri della pulsossimetria: saturazione media (Sp O₂%), indice di desaturazione dell'ossigeno (ODI) e percentuale del tempo trascorso sotto il 90% della saturazione. (Sp <90%). A 21 pazienti (43%) è stata posta indicazione per la ventilazione non invasiva, rifiutata in 4 casi. L'analisi statistica ha mostrato una correlazione significativa tra i dati spirometrici diurni e, rispettivamente, SpO₂% ed Sp <90%, mentre non vi era correlazione tra ODI ed i volumi polmonari statici e dinamici. Questi risultati preliminari fanno ben sperare per la ricerca di parametri predittivi delle desaturazioni notturne nei pazienti DM1.

Glicogenosi di tipo II (GSDII) forma adulta: analisi della nostra casistica e risultati preliminari dopo trattamento con terapia enzimatica sostitutiva (ERT)

Di Giacompo R, Catteruccia M, Macagno F, Conti G, Servidei S

Università Cattolica, Roma, Italia

La ERT con α -glucosidasi acida (GAA) ricombinante umana rappresenta l'unico trattamento attualmente disponibile per la GSDII. Abbiamo pertanto rivalutato 10 pazienti con forma adulta alla luce di tale prospettiva terapeutica. Tutti i pazienti hanno eseguito

esame neurologico, ecografia epatica, audiometria, MRI cardiaca e muscolare, spirometria, polisonnografia, biopsia muscolare e scale quantitative sulla disabilità e sulla fatica. 5 hanno iniziato il trattamento con ERT (20 mg/Kg bisettimanali). L'attività residua della GAA muscolare variava dallo 0 al 14%. Otto/10 pazienti manifestavano deficit di forza cingolare, e cinque di loro insufficienza respiratoria, due iperCPKemia asintomatica; tra le manifestazioni extra-muscolari cinque presentavano glicogenosi epatica, una glicogenosi cardiaca, una aritmia cardiaca, quattro di 5 pazienti studiati ipoacusia neurosensoriale. Dopo sei mesi di trattamento 2/2 pazienti avevano ridotto il numero di ore di ventilazione giornaliera, 3/5 avevano migliorato le loro prestazioni motorie, 5/5 la percezione della propria qualità di vita. Lo studio estensivo dei nostri pazienti ci ha permesso di individuare alcune manifestazioni atipiche per la GSDII ad insorgenza tardiva, come cardiopatia da accumulo di glicogeno ed ipoacusia neurosensoriale. La marcata eterogeneità clinica richiede inoltre un'attenta selezione dei pazienti da trattare. Un maggior numero di osservazioni da follow-up a lungo termine e da studi multicentrici è necessario per confermare la consistenza degli effetti positivi della ERT nell'adulto.

La funzione ventilatoria nei pazienti con Distrofia miotonica di tipo I

Di Gregorio MG*, Scutifero M*, Cecio MR*, Spina F*, Russo R*, Palladino A*, Fiorentino G[^], Politano L*

*Servizio di Cardiomiologia e Genetica Medica, [^]Servizio di Fisiopatologia Respiratoria, Seconda Università di Napoli, Italia

La sindrome disventilatoria restrittiva (SDR), spesso associata a sonnolenza e deficit d'attenzione, è frequente nella Distrofia Miotonica di tipo I (DM1). Di solito progressiva, spesso richiede l'utilizzo di ventilazione meccanica assistita (VMA). Allo scopo di valutare l'effetto della VMA sulla sonnolenza diurna e la sindrome di apnea notturna ostruttiva, 136 pazienti DM1, 89 maschi e 47 femmine, età media 47,3 anni, consecutivamente arruolati nel periodo 2003-7 nell'ambito del progetto Telethon-RAMYD, sono stati sottoposti a controlli respiratori, mediante visita clinica, BMI, EGA, spirometria ed indici pressori (MIP e MEP), e somministrazione della scala di Epworth (ESS) per la valutazione della sonnolenza diurna. 36 pazienti (26,4%) hanno mostrato una SDR di grado moderato-grave caratterizzata da FVC < 60% dell'atteso, modica ipossia, MIP < 60 cmH₂O e MEP < 50 cmH₂O. Tredici pazienti (36,1%) con BMI > 25 ed ESS > 12 hanno effettuato polisomnografia. L'analisi ha mostrato presenza di ipo-apnea centrale ed apnea durante le fasi 1 e REM del sonno, ed ipoventilazione alveolare. In 7 pazienti con indice di ipoventilazione > 10 è stata prescritta VMA notturna per via nasale, mediante BiPAP. Il controllo a 3 mesi ha mostrato riduzione della sonnolenza diurna (ESS < 12) e

concomitante miglioramento della qualità di vita in tutti i pazienti.

Eccessiva sonnolenza diurna nei pazienti con distrofia miotonica tipo I: correlazione con l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene

Falorni M*, Volpi L*, Calsolaro V*, Bonanni E*, Rocchi A*, Monzani F[^], Emdin M[°], Pieri F§, Ravelli V§, Siciliano G*

*Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurologica, [^]Dipartimento di Medicina Interna, [°]Dipartimento di Medicina Cardiovascolare, Istituto di Fisiologia Clinica, Pisa, §Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurochirurgia, Università di Pisa, Italia

Lo scopo dello studio è stato valutare la presenza di alterazioni del ritmo sonno-veglia in un gruppo di pazienti con DMI e correlarle ad eventuali disfunzioni endocrine dell'asse ipotalamo-ipofisario. E' stata inoltre valutata l'influenza del chemo e del baroriflesso sull'EDS. Sono stati inclusi 8 soggetti con DMI, sottoposti ad uno studio polisonnografico notturno e diurno, uno studio endocrinologico dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e la valutazione del chemo-baroriflesso. Il valore medio del MSLT è risultato significativamente più basso nei pazienti rispetto ai controlli; 6 degli otto soggetti avevano un problema di EDS, ma solo uno presentava apnee notturne e soltanto uno movimenti periodici agli arti inferiori. I dati ottenuti sulla macrostruttura hanno indicato un sonno frammentato nei pazienti con DMI. Inoltre viene evidenziato quanto sia frequente l'eccessiva sonnolenza diurna e come questo aspetto probabilmente non sia legato ai disturbi respiratori durante il sonno ma ad una alterazione di meccanismi centrali. Tra i parametri dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene è stata osservata una correlazione tra aldosterone e MSLT suggerendo un possibile ruolo di questo ormone nella patogenesi dei disturbi del ritmo sonno-veglia.

Registro Italiano per i pazienti DMD/BMD e SMA

Fiorillo C*, Cerardini F[^], Ambrosini A*, Baldini R[°], Buccella F[^], Fontana A§, Marchetti D#, Bertini E**, Mercuri E^{^^}

*Fondazione Telethon, [^]Parent Project Italy, [°]ASAMSI, §UILDM, #Famiglie SMA, **Ospedale Bambin Gesù, ^{^^}Università Cattolica Sacro Cuore, Roma, Italia

I progressi scientifici hanno da un lato permesso una migliore comprensione della patogenesi delle malattie neuromuscolari e dall'altro hanno aperto nuovi orizzonti terapeutici. In questo scenario è nata l'esigenza di creare un registro di dati clinici e genetici dei pazienti affetti da queste malattie, in particolare DMD/BMD e SMA. Obiettivi del registro. 1) Ottenere dati epidemio-logici aggiornati di questi pazienti; 2) omologare i dati inseriti al fine di ottenere accurate informazioni cliniche e genetiche per ogni paziente; 3) facilitare la selezione di pazienti idonei a partecipare a specifici trial clinici. Il registro on-line è facilmente accessibile ai pazienti ed ai medici. La registrazione è

protetta da pass-word ed è possibile solo dopo aver firmato il consenso informato. Le informazioni cliniche e genetiche sono inserite in una scheda con un numero minimo di domande con risposte a scelta multipla per rendere rapida e omogenea la compilazione. I campi sono divisi in una sezione di dati obbligatori (diagnosi genetica, stato di malattia, terapie in corso e concomitanti patologie ortopediche, cardiologiche e respiratorie) ed una di dati facoltativi, ma fortemente consigliati (familiarità, risultati della biopsia muscolare e di altri eventuali esami). Le informazioni sono controllate e validate da un genetista e da un clinico e saranno aggiornate ogni 6 mesi od in seguito ad eventi significativi per il paziente.

Disturbi respiratori del sonno nella distrofia muscolare facio-scapolo-omeroale

Frusciante R*, Della Marca G*, Dittoni S*, Vollono C[^], Iannaccone E*, Rossi M[^], Scarano E[°], Pirroni T§, Mazza S*, Tonali PA[^], Ricci E[^]

*Dipartimento di Neuroscienze, [°]Istituto di Otorinolaringoiatria, §Dipartimento di Bioimmagini e Scienze Radiologiche, Università Cattolica del S. Cuore, [^]Fondazione Don Carlo Gnocchi, Roma, Italia

I disturbi respiratori nel sonno (SDB) sono frequenti nelle Distrofie Muscolari e consistono in apnee ostruttive e/o ipoventilazione alveolare in REM. La Distrofia Muscolare Facio-scapolo-omeroale (FSHD) è una delle forme più frequenti di Distrofia Muscolare, ma non sono disponibili osservazioni sistematiche circa lo SDB in questa malattia. L'obiettivo della presente ricerca è di valutare il pattern respiratorio nel sonno di Pazienti con FSHD. Sono stati arruolati 51 Pazienti adulti consecutivi affetti da FSHD, 23 donne e 28 uomini, di età media 45.7±12.3 anni (range: 26-72). La diagnosi di FSHD è stata posta su base clinica e confermata da test genetici. Tutti i Pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione soggettiva del sonno e ad una polisunnografia notturna in laboratorio. 4 Pazienti su 51 presentavano SDB di grave entità, tale da richiedere trattamento con ventilazione a pressione positiva nel sonno (CPAP). 20/51 presentavano indici di apnea-ipopnea o indici di desaturazione patologici. 13/20 presentavano un indice di eventi ostruttivi elevato (>5 eventi/h). La presenza dello SDB non era correlata alla gravità clinica della FSHD. Il Body Mass Index, la circonferenza del collo e la sonnolenza diurna non permettevano di predire la presenza di disturbi respiratori nel sonno. I risultati suggeriscono che vi è una elevata prevalenza di SDB nei Pazienti con FSHD. La presenza di SDB non dipende dalla gravità clinica della malattia. I disturbi respiratori nel sonno possono essere asintomatici, e nessun segno clinico consente di diagnosticarne la presenza in modo affidabile. Uno screening delle anomalie respiratorie nel sonno dovrebbe essere incluso nella valutazione clinica dei Pazienti con FSHD.

Bortezomib incrementa l'espressione di distrofina e componenti del complesso distrofinico in modelli

patologici e sperimentali di Distrofia Muscolare di Duchenne

Gazzerro E*, Assereto S*, Chiavarina B*, Sotgia F[^], Bruno C*, Lisanti M[^], Minetti C*

**Unità di Malattie Muscolari e Neurodegenerative, Istituto Gaslini, Genova, ^Kimmel Cancer Center, Dept. of Cancer Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA*

Numerosi dati indicano che in pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne e Becker (DMD e BMD) uno dei meccanismi di degenerazione delle fibre muscolari è costituito da un'over-attivazione del sistema ubiquitina-proteasoma. Le proteine mutate e le molecole a loro associate presentano difetti strutturali che modificano la loro localizzazione sulla membrana plasmatica; esse sono dunque trattenute in un compartimento intracellulare dove vengono rapidamente degradate dal proteasoma. Abbiamo analizzato gli effetti di bortezomib, un inibitore del proteasoma che è stato già approvato per il trattamento del mieloma multiplo recidivante. Bortezomib è particolarmente interessante poiché inibisce anche l'attivazione di Nuclear Factor-kappaB (NF-kB), una molecola coinvolta nella risposta infiammatoria della DMD. Inoltre, gli effetti collaterali di questo farmaco sono stati già studiati. Abbiamo determinato gli effetti di bortezomib in 2 modelli sperimentali: espunti da biopsie muscolari di pazienti affetti da DMD o BMD e topi mdx. I nostri risultati indicano che: (i) bortezomib può ripristinare l'espressione in membrana della distrofina e dei componenti del complesso distrofinico in espunti di pazienti BMD; (ii) bortezomib incrementa i livelli delle proteine associate alla distrofina in pazienti DMD. In parallelo, abbiamo somministrato bortezomib per via sistemica per 1 settimana in topi mdx di 14 settimane, e abbiamo quindi indagato gli effetti del farmaco su sezioni di tessuto da muscolo gastrocnemio tramite analisi immunoistochimica. Il trattamento con bortezomib incrementa significativamente i livelli d'espressione e la localizzazione in membrana di β -dystroglican, α -sarcoglican, e distrofina. Questi dati indicano l'importanza di studi a lungo termine in grado di determinare la valenza terapeutica di questo farmaco nelle distrofie muscolari.

Iper-MacroCKemia di tipo 1: due casi clinici.

Iacopetti V*, Ricci G[^], Neri R*, Vesprini E*, Baldini C*, Caldarazzo E[^], Caponi L^o, Siciliano G[^], Murri L[^], Bombardieri S*

**Dipartimento di Medicina Interna, ^Dipartimento di Neuroscienze, °Dipartimento di Patologia Sperimentale Biotecnologie Mediche, Università di Pisa, Italia*

La Macro Creatin chinasi (Macro-CK) è un complesso di alto peso molecolare, che risulta dalla polimerizzazione degli isoenzimi della CK (CK-MM, CK-MB o più comunemente CK-BB) con immunoglobuline di classe IgG (Macro-CK di tipo 1) o da oligomeri di CK mitocondriale (Macro-CK di tipo 2). La forma di tipo 1 in genere si associa a patologie

autoimmuni, malattie reumatologiche o miopatie infiammatorie, ma può altresì essere rilevata in soggetti sani; la forma di tipo 2 è tipicamente descritta come marker di malattia neoplastica, quale espressione di degenerazione mitocondriale e necrosi tissutale. Questi macroenzimi hanno una ridotta clearance plasmatica, per cui una più lunga emivita, e necessitano di analisi elettroforetica per distinguerli dagli isoenzimi noti. Riportiamo due casi clinici con iper-MacroCKemia di tipo 1. Primo caso: donna di 63 anni con diagnosi clinica di sindrome fibromialgica, data la sintomatologia caratterizzata da mialgie diffuse e positività a tender points, i cui esami ematici mostravano però da alcuni anni lievi e persistenti valori aumentati di CK totale (da 300-400 U/L), in assenza di altre alterazioni alle indagini elettromiografiche ed alla biopsia muscolare. La paziente ha intrapreso terapia con Ademetionina, riportando un parziale beneficio sintomatologico, ma si osservava nello stesso tempo un ulteriore incremento di CK (740 U/L). E' stato pertanto richiesto lo studio dei 3 isoenzimi attraverso indagine elettroforetica, che ha dimostrato la presenza di un 11,5% di Macro-CK di tipo 1, probabilmente responsabile dell'incremento ematico di CK totale. Secondo caso: donna di 77 anni giunta alla nostra attenzione per il riscontro, da alcuni mesi, di un importante aumento di CK (1030 U/L); in considerazione del dato anamnestico di cardiopatia ischemica, è stato richiesto il dosaggio di CK-MB (metodo quantitativo basato su attività enzimatica), che è risultato > di 1000 U/L. La biopsia muscolare risultava ai limiti della norma, con lieve danno di tipo neurogeno. Alla ricerca degli isoenzimi di CK mediante elettroforesi, sono stati ottenuti i seguenti valori: CK-MB 11,4%, CK-MM 0,0%, CK-BB 0,0% e Macro-CK di tipo 1 88,6%, quest'ultima tale da interferire sui valori dei precedenti dosaggi. In conclusione, nei pazienti con iperCKemia, ai fini di un preciso inquadramento diagnostico, soprattutto quando gli altri dati clinico-laboratoristici non sembrano confermarla, può essere utile il dosaggio di tipo qualitativo degli isoenzimi di CK con tecnica elettroforetica.

Definizione di un valido strumento statistico atto a quantificare la disabilità nei pazienti affetti da Distrofia Facio-Scapolo Omerale

Lamperti C, Fabbri G, Greco F, Servida M, Vercelli L, Fiorillo C, Borsato R, Cao M, Cudia P, Frusciante R, Di Leo R, D'Amico R, Volpi L, Ricciardi L, Pastorello E, Galluzzi G, Siciliano G, Di Muzio A, D'Angelo G, Rodolico C, Morandi L, Tomelleri G, Trevisan CP, Angelini C, Ricci E, Santoro L, Palmucci L, Moggio M, Tupler R

Progetto Telethon-Clinical Trials 2007

Proporre un approccio omogeneo per raccogliere informazioni cliniche che permettano analisi statistiche in pazienti affetti da Distrofia Facio-Scapolo-Omerale (FSHD). Validare uno score di disabilità standardizzato

e specifico per questa patologia. La FSHD è una miopatia autosomica dominante caratterizzata da un'estrema variabilità clinica. La malattia è associata alla delazione di elementi ripetitivi, chiamati D4Z4, situati nel cromosoma 4. E' stata messa a punto una specifica scheda di valutazione atta ad indagare la storia clinica dei pazienti FSHD e ottenere una quantificazione funzionale della stenia attraverso un questionario che permette di assegnare uno score di disabilità, che va da 0-15, specificamente modificato per tali pazienti. Lo score finale è la somma della valutazione indipendente di 6 distretti (muscolatura del volto, del cingolo scapolare, degli arti superiori, del cingolo pelvico, degli arti inferiori e della muscolatura addominale). Al fine di valutare la robustezza statistica e l'indipendenza della valutazione tra i diversi esaminatori, sono stati studiati 70 pazienti. Ciascun paziente è stato valutato contemporaneamente almeno da 5 neurologi appartenenti agli 11 istituti coinvolti in questo studio. Ciascun clinico ha attribuito in modo indipendente lo "FSHD disability score". Lo studio è stato condotto in 5 incontri nei quali sono state compilate un totale di 248 schede. L'analisi statistica ha permesso di valutare la concordanza tra i giudizi dei valutatori che è stata misurata con la statistica k. I valori della statistica sono stati interpretati utilizzando la classificazione di Landis e Koch. La concordanza dei giudizi degli esaminatori è risultata pressoché perfetta per ogni distretto esaminato. Abbiamo dimostrato che lo score di disabilità da noi proposto, e derivante dalla valutazione clinica dei pazienti, è indipendente dall'esaminatore, essendo presente una quasi perfetta concordanza statistica (overall K = 0,92). Riteniamo che lo "FSHD disability score" sia uno strumento utile nella correlazione genotipo/fenotipo nella FSHD. Pensiamo inoltre che questo strumento potrà essere utilizzato per ottenere informazioni riguardo la storia naturale della malattia in previsione di un Registro Italiano della FSHD.

Metodo di studio della via intracellulare insulino-mediata nella distrofia miotonica tipo 1 (DM1)

Latino P, Bucci E, Clemenzi A, Morino S, DiPasquale A, Fornasiero A, Garibaldi M, Antonini G
Dipartimento di Neurologia, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italia

L'insulino-resistenza spesso associata alla DM1, è stata attribuita ad un'alterazione dello splicing alternativo del recettore insulinico (IR) con conseguente espressione dell'isoforma recettoriale A, a minor efficienza funzionale rispetto all'isoforma B. La via intracellulare dell'insulina è costituita da una cascata fosforilativa che coinvolge tre enzimi: IP-3K, PKB/Akt, GSK3-β. Il Ca⁺⁺ può attivare la via agendo direttamente sul secondo messaggero (IP-3K), permettendo così di bypassare l'IR. Abbiamo messo a punto una metodica che consente di studiare la cascata fosforilativa insulino-mediata, attraverso la stimolazione diretta via IR o la stimolazione indiretta

Ca⁺⁺ indotta. Abbiamo usato tale metodica in uno studio caso-controllo, su 10 pazienti DM1, senza diabete e/o insulino-resistenza e 10 controlli sani. Abbiamo valutato la fosforilazione di PKB/Akt in linfociti stimolati con insulina umana ricombinante e in linfociti stimolati con Ionomicina-PMA, ionofori del Ca⁺⁺. Una parte di cellule incubate, ma non stimolate, sono state usate come baseline. Il grado di attivazione di PKB/Akt nelle cellule DM1 stimolate con insulina era significativamente inferiore a quello dei controlli, mentre era sovrapponibile ai controlli nelle cellule stimolate con Ionomicina-PMA. Questa metodica ci consente di valutare le caratteristiche del segnale intracellulare insulinico nei pazienti DM1, facendo ipotizzare un'alterazione di tale segnale anche nei pazienti DM1 senza diabete o insulino-resistenza.

Stop codons, duplicazioni e delezioni: caratterizzazione genetica e follow-up clinico in una coorte di 201 pazienti affetti da DMD

Magri F, Virgilio R, Del Bo R, Ghezzi S, Tedeschi S, D'Angelo MG, Coviello D, Prella A, Bordoni A, Sciacco M, Lamperti C, Corti S, Torrente Y, Moggio M, Bresolin N, Comi GP

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Milano, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Padiglione Ponti, Via Francesco Sforza 35, 20122 Milano, Italia

Nella Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) sono stati proposti nuovi approcci farmaco-genomici (exon-skipping e stop-codon readthrough), che possono essere effettuati solo in gruppi specifici di pazienti, selezionati sulla base della natura della mutazione. Abbiamo studiato le caratteristiche genetiche e cliniche di un'ampia coorte di pazienti DMD, per stimare la frequenza relativa dei diversi tipi mutazionali, definire la presenza di correlazioni genotipo-fenotipo e selezionare sottopopolazioni specifiche definite in base a criteri genetici. L'analisi genetica è stata effettuata con Multiplex PCR e Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, e, nei negativi, sequenziamento dei 79 esoni e del promoter muscolare. La casistica ha incluso 201 pazienti (182 famiglie indipendenti, follow-up medio: 11.54 anni. Sono state riscontrate le seguenti mutazioni: delezioni 63%, duplicazioni 13%, mutazioni puntiformi in 16 probandi (12 mutazioni nonsense, 4 splicing site) e micro-riarrangiamenti in 5. Le mutazioni puntiformi sono distribuite lungo il gene. La distribuzione dei codoni di stop è la seguente: 5 TGA, 4 TAG, 3 TAA. I pazienti, suddivisi in base alla categoria mutazionale, non differiscono per interessamento muscolare, cardiaco e respiratorio. Lo studio caratterizza un'ampia casistica nazionale DMD sia clinicamente che geneticamente. La tipologia mutazionale non influenza il fenotipo muscolare e cardiaco. Lo studio ha consentito di selezionare coorti di pazienti potenziali candidati per nuove terapie farmacologiche.

Valutazione della forza muscolare con miometro computerizzato nella distrofia miotonica tipo I: correlazione con la miotonia

Manca ML, Tramonti C, Falorni M, Volpi L, Calsolaro V, Rocchi A, Siciliano G, Murri L

Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurologica, Università di Pisa, Pisa, Italia

Nella distrofia miotonica risulta frequentemente arduo valutare quanto l'alterazione dell'eccitabilità sarcolemmale, alla base del fenomeno miotonico, condizioni l'entità della prestazione motoria. Obiettivo della ricerca è stato pertanto quello di sviluppare, in una casistica di pazienti affetti da Distrofia Miotonica tipo I (DM1), un metodo per la misurazione della forza muscolare sui muscoli volari dell'avambraccio durante un protocollo di fatica, mediante miometro computerizzato e valutazione semiquantitativa del fenomeno miotonico. Sono stati inclusi nello studio 20 soggetti con DM1, sottoposti ad un esercizio intermittente all'avambraccio, dopo aver valutato per ciascun paziente la contrazione volontaria massimale (CVM) dei muscoli flessori delle dita ("hand grip"). L'esercizio, intermittente e incrementale, prevedeva 3 steps successivi: 10, 40 e 70% della CVM, ciascuno della durata di 1 min, intervallati a 2 min di riposo. Il test era eseguito con dinamometro computerizzato (ditta Mecmesin), e prevedeva la stima dell'indice di fatica. I soggetti sono stati sottoposti anche a scala MRC e a valutazione del fenomeno miotonico, stimato con scala arbitraria, con punteggio da 0 a 4. Due pazienti, con punteggio 2 alla scala MRC ai flessori delle dita della mano, non sono riusciti a svolgere l'esercizio incrementale. L'analisi delle correlazioni statistiche ha evidenziato una correlazione inversa e significativa tra i punteggi alla scala MRC e alla scala della miotonia, mentre si è osservata una tendenza inversa, benché non statisticamente significativa, tra l'indice di fatica e la scala di severità del fenomeno miotonico, confermando come tale componente sia rilevante nel modulare il deficit funzionale motorio della DM1.

Caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali della biopsia muscolare nella miastenia gravis con MUSK-Ab e AChR-Ab

Martignago S*, Cenacchi G[^], Albertini E*, Fanin M*, Pegoraro E[^], Angelini C*

**Dipartimento di Neuroscienze, Università di Padova, ^Dipartimento di Scienze Radiologiche ed Istocitopatologiche, Università di Bologna, Italia*

Abbiamo analizzato biopsie muscolari di 13 pazienti con miastenia gravis (MG), 7 positivi agli anticorpi anti-recettore per l'acetilcolina (AChR-Ab+) e 6 positivi agli anticorpi anti-tirosin chinasi muscolo-specifica (MuSK-Ab+), per quantificare l'atrofia e descrivere il pattern istopatologico. Nei pazienti AChR-Ab+ abbiamo riscontrato un maggior grado di atrofia rispetto ai pazienti MuSK-Ab+ (fattore di atrofia rispettivamente di 494 contro 210 per le fibre di tipo I e 1023 contro 300 per le fibre di tipo II). L'indagine morfologica ha

rilevato la presenza di raggruppamenti omotipici fibrili di entrambi i tipi di fibre nei casi AChR-Ab+ e la presenza di una percentuale significativa di fibre COX-negative nei casi MuSK-Ab+. All'indagine ultrastrutturale le miofibre dei pazienti AChR-Ab+ presentavano nuclei picnotici, disarrangiamento miofibrillare e mitocondri disposti perpendicolarmente rispetto ai sarcomeri. Nei casi MuSK-Ab+ era presente rigonfiamento dei mitocondri e disgregazione delle cristae. I risultati ottenuti suggeriscono che MuSK-Ab e AChR-Ab si associano ad alterazioni muscolari differenti. Gli AChR-Ab causano atrofia muscolare di grado elevato, accompagnata da anomalie neurogene mentre i MuSK-Ab si accompagnano a segni miopatici con evidenti anomalie mitocondriali. L'interessamento mitocondriale potrebbe spiegare il coinvolgimento della muscolatura oculo-bulbare nei pazienti MuSK-Ab+.

Caratterizzazione molecolare nelle miopatie da Collagene VI mediante sequenziamento estensivo, analisi trascrizionale ed array CGH

Martoni E*, Bovolenta M*, Fabris M*, Grumati P[^], Urciolo A[^], Trabanelli C*, Venturosi A*, Fini S*, Previtali S^o, Mercuri E§, Messina S§, Ricci Eç, Bestini E**, D'Amico A**, Maioli MA^{^^}, Giovanni Marrosu G^{^^}, Moranti L^{oo}, Pegoraro E§§, Sabatelli Pçç, Merlini L*, Bernardi P***, Bonaldo P[^], Ferlini A*, Gualandi F*

Sezione di Genetica Medica, Università di Ferrara., ^Dip. Istologia, Microbiologia e Biotecnologie, Università di Padova., ° Unità di Neuropatologia, San Raffaele, Milano, § Dip. Neurologia Infantile e Psichiatria, Università Cattolica, Roma., ç Istituto di Microbiologia, Università Cattolica, Roma., ** Unità di Medicina Molecolare, Ospedale Bambin Gesù, Roma., ^^ Dip. Scienze Cardiovascolari e Neurologiche, Università di Cagliari., oo Istituto Neurologico Nazionale C. Besta, Milano., §§ Dip. Neuroscienze, Università di Padova, çç IGM-CNR, IOR, Bologna, * Dip. Scienze Biomediche, Università di Padova, Italia*

Le miopatie da collagene VI sono riconducibili a mutazioni nei geni COL6A1, A2 e A3. Abbiamo caratterizzato molecularmente un gruppo di pazienti con diagnosi clinica/immunoistochimica di Miopatia di Ullrich (UCMD) (23), Miopatia di Bethlem (BM) (21), distrofia dei cingoli (LGMD) (1) e Miosclerosi (1). Ad oggi abbiamo identificato 20 diverse mutazioni in 17 pazienti non relati (12 UCMD; 3 BM, 1 LGMD and 1 Myosclerosis). La maggioranza sono nuove e coinvolgono i domini TH e C-terminale del gene COL6A2 (11 su 20). Le mutazioni in COL6A1 e A3 (6 e 3), sono localizzate nei domini NH and TH. Abbiamo identificato 8 variazioni missenso e 2 nonsense, 5 piccole inserzioni/delezioni e 5 mutazioni introniche di splicing. La patogenicità delle variazioni identificate è stata indagata mediante analisi di RNA da tessuti, analisi di segregazione in famiglie informative e studi di cromosomi di controllo. Inoltre, abbiamo disegnato un array Agilent per CGH (Comparative Genomic Hybridization). Tutte le regioni regolative e

codificanti dei geni COL6A e di altri 10 geni, selezionati in base al loro rapporto funzionale con il collagene VI, sono state incluse nell'array, attualmente in studio.

MNGIE ad esordio tardivo senza neuropatia periferica associata a mutazioni in ECGF1

Massa R*, Tessa A[^], Rocchi C*, Margollicci MA[°], Carozzo R[^], Bernardi G*, Santorelli FM*

*Dipartimento di Neuroscienze, Università di Roma "Tor Vergata", Roma; *Unità Operativa di Medicina Molecolare, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma; °Lab. di Genetica Metabolica, Dipartimento di Pediatria, Università di Siena, Siena, Italia

L'encefalopatia mioneurogastrointestinale (sindrome MNGIE, MyoNeuroGastroIntestinal Encephalopathy) è una patologia della fosforilazione ossidativa causata da mutazioni nel gene ECGF1, che codifica la timidina fosforilasi (TP), un enzima cruciale nel mantenimento del pool nucleotidico intramitocondriale. Le caratteristiche cliniche della MNGIE sono: una severa dismotilità gastrointestinale, cachessia, neuropatia periferica, ptosi palpebrale, oftalmoplegia, e leucoencefalopatia, evidente alla RMN. La sindrome MNGIE ha usualmente un esordio precoce (età media 19 anni) ed una prognosi severa (età media al decesso 37 anni), ma sono stati descritti tre pazienti con un esordio tardivo ed alterazioni biochimiche meno marcate di TP. Noi descriviamo il caso di una donna con esordio, dall'età di 53 anni, di una severa dismotilità gastrointestinale con emorragie e perforazioni ileali, cachessia, ptosi palpebrale bilaterale, oftalmoplegia esterna progressiva, e disturbi dell'equilibrio e della marcia. Giungeva alla nostra osservazione all'età di 65 anni, presentando tutte le caratteristiche cliniche della MNGIE, eccetto la neuropatia periferica. Una EMG mostrava la diffusa presenza di PUM di ampiezza e durata ridotta, indicativa di miopatia; la ENG era nella norma. I valori di acido lattico erano elevati sia nel siero che nel liquor. La RMN dell'encefalo evidenziava una diffusa leucoencefalopatia biemisferica e ponto-mesencefalica. Una biopsia muscolare documentava la presenza di fibre "ragged red", iperreattive alla colorazione istoenzimatica per la SDH, e numerose fibre COX-negative. Il dosaggio enzimatico su leucociti evidenziava livelli di TP al limite inferiore della norma (132 nmol/h/mg; V.N. 120 - 980). Mentre l'analisi diretta del gene POLG1 non mostrava alterazioni di significato patogenetico, il sequenziamento del gene ECGF1 evidenziava due mutazioni eterozigoti, la nuova c.1268G>A (p.Glu379Lys) e la mutazione IVS8-1G>A nel sito accettore per lo splicing. L'analisi mediante Southern blotting e real-time PCR mostrava una parziale deplezione del DNA mitocondriale (43% della norma). La paziente descritta rappresenta, a nostra conoscenza, il caso di MNGIE con l'età più avanzata sia all'esordio che all'osservazione. L'esordio tardivo e la presentazione clinica incompleta, per

l'assenza di neuropatia, sembrano correlati alla perdita parziale dell'attività della TP che, pur rientrando nei limiti inferiori della normalità, si è associata al fenotipo MNGIE.

Identificazione di una mutazione omozigote nel gene del Recettore della Rianodina (RyR1) associata a Central Core Disease

Melli G*, Colleoni L*, Bernasconi P*, Romaggi S*, Tegazzin V*, Mantegazza R[^], Morandi L*

*U.O. Neurologia IV, Fondazione Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano; ^Dipartimento di Anestesia, Ospedale S. Antonio, Padova, Italia

La malattia 'central core' (CCD) è una forma rara di miopatia congenita caratterizzata da ipotonia e debolezza muscolare prossimale e dalla presenza di aree di ridotta o assente attività degli enzimi ossidativi (cores) nella biopsia muscolare. La CCD è causata da mutazioni localizzate prevalentemente nel dominio C-terminale nel gene RYR1, che codifica per il canale del reticolo sarcoplasmatico deputato al rilascio di Ca²⁺. Mutazioni nella porzione N-terminale e centrale dello stesso gene si associano prevalentemente a ipertermia maligna (MH). Descriviamo una famiglia composta da genitori consanguinei e clinicamente asintomatici, e due figlie entrambe affette da CCD. L'esame clinico evidenzia alterazioni scheletriche, atrofia dei muscoli distali degli arti inferiori, ipostenia più evidente a carico dei muscoli del cingolo pelvico e prossimodistali degli arti inferiori. La biopsia muscolare mostra anisometria dei diametri fibrili, centralizzazioni nucleari e cores nella maggior parte delle fibre. Abbiamo identificato una mutazione nella porzione C-terminale (esone 85; c.11708G>A; p.R3903Q) del gene RYR1, presente in forma omozigote nelle figlie ed eterozigote nei genitori. Questa mutazione in forma eterozigote è stata raramente descritta in associazione con MH. Sulla base dei nostri dati è ipotizzabile che la stessa mutazione in forma omozigote possa influire severamente sulla proteina tetrameric RyR1, causando un fenotipo CCD.

Correlazioni genotipo-fenotipo nelle distrofie muscolari congenite con riduzione dell'alfa-distroglicano: uno studio italiano multicentrico

Messina S*[^], Santorelli FM[°], Mora M§, Bruno Cç, Pegoraro E**[^], Berardinelli A^{^^}, Comi GP^{°°}, Biancheri Rç, D'Amico A[°], Farina L§, Pini A§§, Mongini T*, Morandi L§, Moroni I§, Uggetti C^{^^}, Pane M*, Pichiechio A^{^^}, Ruggieri A§§, Scuderi C***, Toscano A[^], Trevisan CP**[^], Bertini E^{°°}, Mercuri E*

*Unità di Neuropsichiatria Infantile, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma; ^Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Psichiatriche ed Anestesiologiche, Università di Messina; °Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Bambino Gesù, Roma; §Unità di Miopatia e Neuroimmunologia, Neurologia Pediatrica e Neuroradiologia, Istituto Neurologico C. Besta, Milano; çCentro Malattie Neuromuscolari, Istituto G. Gaslini, Genova; **Dipartimento di Neuroscienze, Università di

Padova, Padova; ^IRCCS Fondazione "C. Mondino", Università di Pavia, Pavia; °IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Milano; §§Unità di Neuropsichiatria Infantile, Ospedale Maggiore, Bologna; ççCentro Neuromuscolare, Ospedale S.G. Battista, Università di Torino, Torino; ***IRCCS Oasi Maria SS, Unità di Neurologia, Troina, Italia

Le distrofie muscolari congenite con ridotta glicosilazione dell'alfa-distroglicano sono un gruppo eterogeneo di malattie associate a mutazioni in 6 geni per la sintesi di proteine con attività glicosiltrasferasica. Mutazioni in ognuno di questi geni danno origine ad un'ampia variabilità fenotipica. Nel contesto di uno studio multicentrico che ha coinvolto i principali centri neuromuscolari italiani abbiamo analizzato i 6 geni in 88 pazienti con DMC e riduzione dell'alfa-distroglicano alla biopsia muscolare (n=59) o un fenotipo suggestivo di alfa-distroglicanopatia con alfa-distroglicano normale (n=10) o in cui la biopsia muscolare non era disponibile (n=19). Lo scopo dello studio è stato di stabilire la prevalenza delle mutazioni in questi geni nella popolazione italiana e lo spettro fenotipico associato. Mutazioni omozigoti ed eterozigoti composte sono state identificate in 40 individui di 38 famiglie e 46 differenti mutazioni sono state identificate. Mutazioni sono state riscontrate in 32/59 casi con ridotta espressione dell'alfa-distroglicano ed in 8/19 in cui la biopsia muscolare non era disponibile. Nessuno dei pazienti con alfa-distroglicano normale aveva mutazioni nei 6 geni. Le mutazioni in POMT1 erano le più frequenti nella nostra coorte con 15 casi, seguite da POMGnT1 con 12, POMT2 con 7 e FKRP con 6 casi. Nessuna mutazione è stata riscontrata nei geni che codificano fukutin e LARGE. I nostri risultati hanno confermato che mutazioni in questi geni possono essere associate con un'ampia variabilità fenotipica, ma alcuni fenotipi erano più comunemente associati a mutazioni in geni specifici. Nella coorte italiana mutazioni in POMT1 erano più frequentemente associate a RMN cerebrale normale, microcefalia e ritardo mentale (7/15 casi), mentre mutazioni in POMGnT1 erano quasi invariabilmente associate al fenotipo Muscle-Eye-Brain (MEB) (9/12). Mutazioni in POMT2 erano associate ad un predominante coinvolgimento cerebellare in 3 su 7 casi. I pazienti con mutazioni in FKRP invece mostravano un più ampio spettro clinico che andava da forme lievi a fenotipi MEB. I nostri dati allargano lo spettro clinico associato con mutazioni in questi geni e forniscono dati sulla loro prevalenza nella popolazione italiana.

Difetto parziale di caveolina 3 in miopatia con rippling

Mirabella M*, Charlton R^, Valente EM°, Petrini S§, D'AmicoA§, Tasca G*, Roberts M^, Barresi R^, Ricci E*, De Benedetti F§, Bertini E§, Straub V^

*Institute of Neurology, Catholic University, Rome, Italy; ^Institute of Human Genetics, International Centre for Life, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, UK; °IRCCS CSS-Mendel Institute, Rome, Italy; §Unit of

Molecular Medicine, Bambino Gesù' Research Children's Hospital, Rome, Italy

La miopatia con rippling (RMD) è stata associata sia a mutazioni di CAV3 che a sindromi miasteniche immunomediate. Riportiamo 2 pazienti con RMD e difetto acquisto di caveolina-3 immunomediata di origine ancora sconosciuta. Nei due pazienti sono state escluse mutazioni CAV3 e non sono stati riscontrati anticorpi circolanti per AChR o MuSK. Il primo paziente sviluppò una RMD dopo una sindrome influenzale, con mialgie e debolezza ai cingoli intorno all'età di 33 anni. Gli esami elettrofisiologici non mostravano segni neuropatia ed il rippling era elettricamente silente. Il CK nel sangue era intorno a 400U/l. Alla biopsia muscolare si evidenziava un mosaico di espressione della caveolina-3 con segni di lieve variabilità di calibro delle fibre. A distanza di 2 anni il paziente ebbe un recupero spontaneo della sintomatologia. Il secondo paziente esordì con debolezza ai cingoli, e mialgie a 20 anni. Successivamente sviluppò una RMD con mioedema a tutti i gruppi muscolari compresi i facciali. Gli esami elettrofisiologici mostrarono un EMG miopatico in assenza di attività spontanea e di velocità di conduzione nervosa normale. Il CK nel sangue era persistentemente aumentato di 6-8 volte. La biopsia muscolare mostrava moderata variabilità di calibro delle fibre, nessun segno di infiammazione ed un aspetto a mosaico della caveolina-3. La debolezza muscolare è peggiorata gradualmente ed un monitoraggio EKG Holter evidenziò un blocco atrio-ventricolare di 2° grado. Le mialgie sono migliorate con terapia di Dantrolene. Nel sospetto di una malattia immunomediata, la paziente è stata sottoposta a plasmaferesi seguita da terapia steroidea e ciclosporina e da allora sta migliorando. Concludendo, nella RMD acquisita, il difetto di caveolina 3 è immunomediato e può essere spontaneamente reversibile. Inoltre, la malattia può essere efficacemente trattata come una condizione autoimmune. I pazienti vengono monitorizzati con attenzione.

Nuovi metodi non-invasivi di valutazione funzionale di pazienti con miopatie metaboliche

Morandi L *, Porcelli S ^, Marzorati M°, Lanfranconi F ^, Grassi B°§

*Fondazione Istituto Neurologico "Carlo Besta" Milano; ^Dip. Scienze Tecnologie Biomediche, Università di Milano; °IBFM-CNR, Milano; § Dip. Scienze Tecnologie Biomediche, Università di Udine, Italia

Nei pazienti affetti da miopatie mitocondriali (MM) o malattia di McArdle (McA) gli indici di ossigenazione muscolare ottenuti mediante near-infrared spectroscopy (NIRS) sono risultati in grado di identificare e quantificare la limitazione funzionale del metabolismo ossidativo. Abbiamo studiato la cinetica di adeguamento del consumo di O2 polmonare (VO2) durante la transizione da riposo ad esercizio a carico costante, allo scopo di verificare se questa correla con gli indici

NIRS. Sono stati studiati 13 MM, 7 McA, 37 pazienti con segni/sintomi di miopatia ma biopsia negativa (P-CTRL) e 28 controlli (CTRL). La cinetica di VO₂ è risultata più lenta in MM (costante di tempo [tau] 60,1±9,7 s) ed in McA (76,4±13,0) rispetto a P-CTRL (35,9±2,1) e CTRL (35,9±2,0) (differenze tra MM e McA e tra P-CTRL e CTRL statisticamente non-significative). In McA la tau della cinetica di VO₂ è risultata negativamente correlata all'indice NIRS che quantifica la ridotta capacità di estrazione di O₂ del muscolo. Nei McA l'analisi della cinetica di VO₂ consente di identificare e quantificare la limitazione funzionale del metabolismo ossidativo. In MM ed in McA la cinetica di VO₂ più lenta contribuisce alla ridotta tolleranza all'esercizio e potrebbe costituire un indice diagnostico ancillare. (Telethon-UILDM GUP030534).

Deficit multiplo di Acyl-CoA Deidrogenasi responsivo alla riboflavina (MADD-RR): studio clinico, biochimico, genetico e spettroscopico

Musumeci O*, Nishino I[^], Garavaglia B^o, Lodi R§, Barbiroli B§, Vita G*, Toscano A*

*Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Psichiatriche ed Anestesiologiche, Università di Messina, [^]National Institute of Neuroscience, Dpt of Neuromuscular Research, Kodaira, Japan. ^oIstituto Neurologico "C. Besta", Milano, § Dipartimento di Neurologia, Università di Bologna, Italia

Il deficit multiplo di Acyl-CoA Deidrogenasi responsivo alla riboflavina (MADD-RR) è una rara malattia autosomica-recessiva legata alle alterazioni dell'attività enzimatica della Beta-ossidazione. Clinicamente si distinguono: una forma neonatale con anomalie congenite (tipo I), una forma neonatale senza anomalie congenite (tipo II) ed una forma ad esordio tardivo (tipo III). Negli ultimi anni sono state identificate diverse mutazioni di tre geni principali (ETFA, ETFB o ETFDH) legati alle alterazioni della Beta-ossidazione. Alcuni pazienti affetti dai suddetti deficit rispondono drammaticamente alla terapia orale con riboflavina. Riportiamo due casi non correlati (44 aa e 14 aa all'esordio della malattia) di MADD-RR: entrambi i pazienti lamentavano mialgie, intolleranza all'esercizio muscolare ed ipostenia prossimale. Il CK serico era elevato (8000 IU/L e 5000 IU/L rispettivamente) così come la lattacidemia prima e dopo esercizio fisico. La biopsia muscolare mostrava una miopatia vacuolare con abnorme accumulo di lipidi. La carnitina muscolare totale e libera era ridotta. Le attività enzimatiche di SCAD, MCAD e LCAD, in mitocondri isolati, erano marcatamente ridotte. Lo studio spettroscopico "in vivo" con 31 P evidenziava una riduzione del potenziale di fosforilazione nel cervello con marcata compromissione della respirazione mitocondriale nel muscolo scheletrico. Dopo due mesi di trattamento con riboflavina (200mg/die), la rivalutazione clinica, morfologica, biochimica e spettroscopica mostrava un netto miglioramento della situazione clinica con una quasi completa remissione dei disturbi.

Dopo un follow-up di circa 10 anni, entrambi i pazienti sono ancora in trattamento con riboflavina e sono clinicamente stabili. Recentemente, lo studio molecolare del gene ETFDH ha evidenziato in questi pazienti tre nuove mutazioni: nel primo paziente una mutazione, in omozigosi, c1531 G>A (D511N) nell'esone 12, mentre nel secondo, in eterozigosi, una mutazione c1366 (p.P456S) nell'esone 11 ed un'altra, c1828 G>A (p.G610R), nell'esone 13. I dati clinici e strumentali ottenuti in questi 2 casi confermano che 1) mutazioni nel gene ETFDH sono frequentemente responsabili della MADD-RR, 2) una prolungata somministrazione di riboflavina può consentire al paziente un'ottima qualità di vita.

La somministrazione di ceftriaxone migliora il fenotipo di un modello murino di Atrofia Muscolare Spinale

Nardini M, Nizzardo M, Donadoni C, Fortunato F, Bresolin N, Comi GP, Corti S

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Milano, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Padiglione Ponti, Via Francesco Sforza 35, 20122 Milano, Italia

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una grave malattia genetica del motoneurone che causa morte in età infantile. Attualmente non si conoscono terapie efficaci e il trattamento è normalmente di solo supporto. E' quindi importante individuare nuove strategie terapeutiche. Gli antibiotici beta-lattamici, come il ceftriaxone, potrebbero esercitare un'azione neuroprotettiva nelle malattie del motoneurone incrementando l'espressione del trasportatore del glutammato. Dal momento che tali antibiotici sono correntemente utilizzati in studi clinici su pazienti con Sclerosi Laterale Amiotrofica, ne abbiamo valutato l'effetto, in particolare del ceftriaxone, in un modello murino di SMA. Abbiamo iniettato intraperitoneo il ceftriaxone giornalmente, dal 5° giorno di vita dei topi SMA fino alla morte e abbiamo osservato le variazioni del fenotipo e della sopravvivenza dei trattati rispetto ai controlli. Gli animali trattati con ceftriaxone mostrano un miglioramento della funzionalità neuromuscolare ed un incremento della sopravvivenza, correlati con la protezione riscontrata nei motoneuroni e nelle unità neuromuscolari. Gli effetti del ceftriaxone sono associati ad un'aumentata espressione nel midollo spinale del trasportatore-1 del glutammato sodio-dipendente (GLT1). Questo studio evidenzia quindi un potenziale effetto terapeutico di questa classe di molecole sul fenotipo SMA.

Profilo trascrizionale delle duplicazioni del gene distrofina in pazienti DMD/BMD

Neri M*, Martoni E*, Bovolenta M*, Fini S*, Spitali P*, Fabris M*, Angelini C[^], Mora M^o, Mongini T§, Bertini Eç, Ricci E**, Vattemi G^{^^}, Mercuri E^{oo}, Rimessi P*, L. Merlini*, Gualandi F*, Ferlini A*

**Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Genetica Medica, Università di Ferrara, ^Dipartimento di Neuroscienze, Università di Padova, °Unità di Immunologia e Miopatologia, Istituto Neurologico C. Besta, Milano, §Dipartimento Neuromuscolare, Ospedale S.G. Battista, Università di Torino,, çUnità di Medicina Molecolare, Ospedale Bambin Gesù, Roma **Istituto di Neurologia, Università Cattolica, Roma, ^Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Verona, §§Dipartimento di neurologia Pediatrica, Università Cattolica, Roma, Italia*

Circa il 15% dei casi di distrofia muscolare di Duchenne/Becker (DMD/BMD) sono causati da duplicazioni nel gene distrofina mentre molto più frequenti sono le delezioni, presenti nel 65% dei pazienti. Nel 90% dei casi la correlazione genotipo-fenotipo e la prognosi genetica sono riconducibili alla teoria del “frame” di Monaco: mutazioni che interrompono il frame di lettura risultano in assenza di proteina e fenotipo DMD mentre mutazioni che permettono il mantenimento del frame e la produzione di proteina sono presenti nei pazienti BMD. In questo lavoro abbiamo identificato 26 diverse duplicazioni, 6 di un singolo esone e 20 coinvolgenti più esoni, di cui 9 non sono mai state descritte in letteratura. Abbiamo caratterizzato a livello trascrizionale 12 di queste duplicazioni. In 3 pazienti BMD, eccezioni alla regola del “frame”, l’analisi RNA ci ha permesso di definire come eventi di exon skipping nella regione duplicata permettano il ripristino del “frame” rendendo quindi ragione del fenotipo clinico inatteso. Al contrario, in un paziente DMD con duplicazione “in-frame” il comportamento trascrizionale non giustifica l’eccezione alla teoria di Monaco, che è probabilmente riconducibile a meccanismi post-trascrizionali. Dal nostro studio emerge come la determinazione del profilo trascrizionale nelle duplicazioni del gene distrofina sia dirimente sia per stabilire una prognosi genetica che per programmare approcci terapeutici basati sulla modulazione dell’RNA eterogeneo.

Trapianto di cellule staminali neuronali derivate da staminali embrionali (ES) come possibile strategia terapeutica per l’Atrofia Muscolare Spinale

Nizzardo M, Corti S, Nardini M, Donadoni C, Fortunato F, Bresolin N, Comi GP
Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Milano, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Padiglione Ponti, Via Francesco Sforza 35, 20122 Milano, Italia

L’Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una forma fatale infantile di malattia del motoneurone, attualmente non esistono terapie efficaci. Il trapianto di cellule staminali potrebbe rappresentare, grazie alla sostituzione dei motoneuroni (MN) danneggiati, una potenziale strategia terapeutica. In questo studio abbiamo analizzato il potenziale terapeutico di cellule staminali neuronali (NSCs) derivate da cellule staminali embrionali murine in un modello murino di SMA. A partire da una linea di mES GFP+, abbiamo ottenuto una popolazione di cellule staminali neuronali che

coesprime marker staminali neuronali. Esponendo tali cellule a un cocktail di fattori di crescita seguito da acido retinoico e sonic hedgehog abbiamo ottenuto il differenziamento in MNs come dimostrato dalla positività per marker motoneuronali e dalla formazione di giunzioni neuromuscolari con i miotubi. Successivamente abbiamo trapiantato intratecalmente le ES-NSCs differenziate in topi SMA neonati. Le NSCs trapiantate sono in grado di migrare all’interno delle meningi, di integrarsi nel parenchima e di differenziare in neuroni e motoneuroni con assoni che si estendono in periferia. Abbiamo valutato la funzionalità neuromuscolare dei topi trapiantati rispetto ai controlli e ne abbiamo registrato la sopravvivenza: gli animali trapiantati mostrano un miglioramento funzionale e un incremento della sopravvivenza significativi rispetto agli SMA trattati con il veicolo. I nostri risultati dimostrano per la prima volta che le ES-NSCs possono esercitare un effetto terapeutico significativo sul fenotipo SMA.

Caratterizzazione molecolare dei geni CLCN1, SCN4A, KCNJ2, CACNA1S in pazienti con canalopatie muscolari

Pagliarani S*, Lucchiari S*, Corti S*, D’Angelo MG^, Magri F*, Raimondi M°, Carpo M*, Bresolin N*^ Comi GP*

**Centro Dino Ferrari, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano, Fondazione I.R.C.C.S. Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano, Italy, ^I.R.C.C.S. Eugenio Medea, Bosisio Parini, Lecco, Italy, °Ospedale Regionale di Lugano, Lugano, Svizzera*

Le canalopatie sono patologie neuromuscolari determinate da alterazioni funzionali dei canali ionici e caratterizzate da eterogeneità fenotipica e genotipica. Abbiamo analizzato i geni CLCN1, SCN4A, KCNJ2, CACNA1S, in una serie consecutiva di probandi, nei quali le indagini anamnestiche, cliniche e neurofisiologiche, erano compatibili con le seguenti diagnosi: Miotonia Congenita di Thomsen e Becker, Paramiotonia Congenita di Von Eulenburg e Paralisi Periodica Ipokaliemica (HOKPP). L’analisi del gene codificante il canale CLC-1 ha condotto all’individuazione di sette nuove mutazioni (R338X, 1110delC, T533I, V536L, Q812X, G846S, V947E), oltre a tre già descritte (F167L, G190S, M485V). Queste mutazioni sono state riscontrate in un caso affetto da Miotonia di Thomsen e in sei pazienti con Miotonia di Becker. I dati clinici caratterizzanti erano: miotonia agli arti superiori, alla lingua, ipertrofia e rigidità muscolare, mentre una paziente presentava dolorabilità che non diminuiva con l’esercizio (no warm-up) e una possibile polineuropatia periferica. Due famiglie affette da paramiotonia congenita avevano le mutazioni R1448C e T1313M nel gene SCN4A, con caratteristico fenomeno miotonico che peggiora con l’esposizione al freddo. Infine un probando dell’età di 15 anni ha manifestato ricorrenti episodi di paralisi periodica

ipokaliemica, dovuta alla mutazione R672H del gene SCN4A trasmessa in forma autosomica dominante. Lo studio conferma l'utilità diagnostica dello screening genetico nelle canalopatie clinicamente caratterizzate.

Salbutamolo in regime quotidiano in bambini con Atrofia muscolare spinale (SMA) tipo II

Pane M*, Stacciali S*, Messina S[^], D'Amico A°, Pelliccioni M*§, Mazzone ES*§, Cuttini M€, Alfieri P*, Battini R**, Main M[^], Muntoni F[^], Bestini E°, Villanova M°, Mercuri M*

*Dipartimento di Neurologia Pediatrica, Università Cattolica, Roma, Italia, ^Dipartimento di Neuroscienze, Psichiatria e Anestesiologia, Università di Messina, Italia, °Unità di Medicina Molecolare, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù Roma, Italia, §UILDM, Unione Italiana Lotta Distrofia Muscolare, Roma, Italia, ζUnità di Epidemiologia, Bambin Gesù, Roma, Italia, **Unità di Neurologia e Psichiatria Pediatrica, Università di Pisa and Stella Maris, IRCSS, Italia, ^Dubowitz Neuromuscular Centre, UCL Institute of Child Health, Londra, UK, °Ospedale Nigrosoli, Bologna, Italia

Lo scopo di questo studio pilota è stato quello di stabilire il profilo di tollerabilità e la responsività clinica in una coorte di bambini affetti da atrofia muscolare spinale (SMA) di tipo II. Ventitre bambini tra i 30 mesi e i 6 anni sono stati trattati con salbutamolo (2 mg tre volte al giorno) per 1 anno. Tutti i bambini sono stati valutati usando la scala di funzionalità motoria Hammersmith per la SMA sei mesi prima di iniziare il trattamento (T0), all'inizio del trattamento (T1) e 6 e 12 mesi dopo. Non vi erano sostanziali modificazioni nella funzione tra T0 e T1, ma il punteggio funzionale raggiunto dopo 6 e 12 mesi dall'inizio del trattamento era significativamente più alto di quello basale ($p=0.006$). Tutti i pazienti hanno completato lo studio senza effetti collaterali. Un piccolo incremento del tremore alle mani è stato riportato in circa la metà dei pazienti appena dopo l'inizio della dose piena di trattamento ma era minimo e tendeva a regredire dopo pochi giorni. I nostri risultati suggeriscono che i pazienti con SMA possono beneficiare del trattamento con salbutamolo senza alcun effetto collaterale maggiore. Più ampi studi prospettici, randomizzati, in doppio cieco e con placebo sono necessari per confermare questi risultati preliminari.

Studio longitudinale del coinvolgimento muscolare e cardiaco nella Distrofia Miotonica di tipo 1 (DM1) e di tipo 2 (DM2)

Panzeri M*, Sansone V*, Briganti S[^], Mauro R*, Montericcio V[^], De Ambroggi L[^], Meola G*

RCCS Policlinico San Donato, Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Neurologia* e Cardiologia[^], Italia

La severità e progressione nel tempo dell'ipostenia e del coinvolgimento cardiaco nella DM2 sono meno definite rispetto alla DM1 e mancano ancora dati longitudinali sulla storia naturale. Obiettivi dello studio sono stati: i) Determinare la severità e la progressione del coinvolgimento muscolare e cardiaco in pazienti

DM2 vs DM1; ii) Verificare la 'benignità' relativa della DM2. 70 pazienti DM1 (45.1 ± 14.4 anni; follow up medio: 3.8 ± 3 anni) e 26 pazienti DM2 (56.6 ± 12.8 anni; follow up medio: 6 ± 4 anni) sono stati sottoposti all'inizio del follow up e ogni 6 mesi a: i) valutazione muscolare (scala MRC); ii) ECG; iii) ECG Holter; iv) Ecocardiogramma. Risultati: i) L'ipostenia muscolare peggiora significativamente sia nella DM1 ($p > 0.0001$) che nella DM2 ($p = 0.024$) ma con una velocità di progressione maggiore nella DM1 vs DM2; ii) Gli intervalli PR e QRS sono significativamente più lunghi nella DM1 rispetto alla DM2. Il QRS aumenta significativamente solo nella DM1 ($p < 0.05$); iii) La FE diminuisce significativamente solo nella DM1 (56%, $p < 0.05$). (iv) E' stato impiantato il PM in 7% pz DM1 (età media: 45.7) e in 7.7% pz DM2 (età: 71 e 69). La ridotta velocità di progressione dell'ipostenia e delle aritmie e la più avanzata età di impianto di PM nella DM2, confermano che l'interessamento neuro muscolo-re e cardiologico è simile ma meno severo e più tardivo nella DM2, confermandone una prognosi migliore.

Metodiche di indagine diagnostica neurofisiologica dei muscoli respiratori

Pasquali L, Murri L

Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurologica, Università di Pisa

Nelle malattie neuromuscolari l'interessamento dei muscoli respiratori si può manifestare con dispnea dapprima da sforzo e successivamente a riposo, con difficoltà nel tossire, nel parlare e nella deglutizione, con cefalea, con disturbi del sonno e sonnolenza diurna. Tuttavia, spesso la compromissione dei muscoli respiratori viene rivelata solo tardivamente nel corso di tali patologie, quando si verificano quadri clinici conclamati di polmonite ab ingestis o di cuore polmonare. Questo ritardo nella diagnosi è sostanzialmente dovuto alla ridotta attività fisica dei pazienti affetti da tali patologie, che contribuisce a non rendere clinicamente manifesto il quadro di insufficienza respiratoria. Per tale motivo un'osservazione clinica accurata dell'attività respiratoria e la determinazione della capacità vitale, che fornisce una stima quantitativa della forza dei muscoli respiratori, sono necessarie al fine di diagnosticare la presenza di un'insufficienza respiratoria precocemente nel corso della patologia. Tra le indagini neurofisiologiche che possono essere di ausilio nella diagnosi di insufficienza respiratoria, la registrazione elettroencefalografica durante il sonno in associazione pulso-ossimetria permette di rilevare presenza di desaturazione arteriosa durante il sonno. Altre tecniche neurofisiologiche, quali la stimolazione elettrica diretta del nervo frenico con registrazione del segnale attraverso elettrodi di superficie sul diaframma, la stimolazione ripetitiva del nervo frenico e l'elettromiografia del diaframma permettono inoltre di stabilire il sito e la natura della disfunzione neuromuscolare.

Le Distrofie muscolari dei Cingoli autosomiche recessive in Sud Italia: Aspetti clinici, genetici ed epidemiologici

Passamano L[^], Ventriglia VM*, Palladino A[^], Aurino S*, Petretta VR[^], D'Amico F*, Paciello O^o, Saccone V*, Piluso G*, Papparella S^o, Nigro V*, Politano L[^]

*Dipartimento di Patologia Generale, SUN, [^]Servizio di Cardiomiologia e Genetica Medica ^oDipartimento di Patologia Animale, Università di Napoli Federico II, Italia

Le Distrofie muscolari progressive dei Cingoli costituiscono un gruppo eterogeneo di miopatie genetiche caratterizzate dal prevalente coinvolgimento dei muscoli del cingolo pelvico e/o scapolare. Diciannove forme sono state sinora identificate, 7 Dominanti e 12 Recessive. Le dominanti sono generalmente più benigne e relativamente rare (10% di tutte le forme); quelle recessive sono più frequenti e mostrano una prevalenza globale di 1:15.000 individui, salvo piccole eccezioni geografiche. Trecentodieci pazienti affetti da Distrofia muscolare dei Cingoli autosomica recessiva, da noi seguiti, sono stati sottoposti a ricerca di mutazioni nei loci noti. Il 62% di essi sono casi isolati ed il 38% familiari. In base al coinvolgimento muscolare i pazienti sono stati suddivisi in 5 sottogruppi fenotipici: 1) Grave; 2) Intermedio; 3) Lieve; 4) IperCKemia isolata; 5) Pre-sintomatici. Mutazioni sono state identificate nel 37% dei casi, con un'incidenza variabile dal 18 al 52% nei vari gruppi. La forma più frequente è risultata essere la LGMD2A (calpainopatia), seguita nell'ordine dalle sarcoglicanopatie (LGMD2C-2F), disferlinopatie (LGMD2B), fukutin-related- protein-patie (LGMD2I) e LGMD2H. Le caratteristiche cliniche e genetiche proprie delle varie forme, le differenze geografiche utili nell'indirizzare la diagnosi clinica e l'approccio molecolare saranno descritte e discusse.

Distrofia Facio-Scapolo-Omerale: deficit uditivo e altri dati atipici in casi con grandi delezioni 4q35

Pastorello E*, Tomelleri G[^], Tonin P[^], Vercelli L^o, Palmucci L^ç, Scapolan S[§], Bruno C[§], Falorni M ^ç, Siciliano G ^ç, Angelini C , Galluzzi G^{**}, Tupler RC^{^^}, Trevisan CP*

*Padova, [^]Verona, ^oTorino, [§]Genova, ^çPisa, ^{**}Roma, ^{^^}Modena, Italia

La mutazione genetica associata alla Distrofia Muscolare Facio-Scapolo-Omerale (FSHD) è rappresentata da una delezione non codificante subtelomerica 4q35, con frammenti residui compresi fra 10 e 38 Kb. Nei pazienti con delezioni più ampie (10-13 Kb), anziché un tipico fenotipo con esordio della malattia in adolescenza, si può presentare una variante più grave con esordio durante la prima infanzia e segni atipici. Il nostro studio ha preso in considerazione la frequenza di ipoacusia e la presentazione di altri aspetti clinici inusuali in pazienti con ampie delezioni 4q35 (frammento EcoR1 tra 10 e 13 Kb). Sono stati considerati tre maschi e tre femmine con età media di 43 anni. Di tali pazienti abbiamo

valutato il quadro clinico, con particolare riferimento al disturbo muscolare, alla possibile presenza di ipoacusia e all'eventuale coinvolgimento del Sistema Nervoso Centrale, considerando soprattutto il ritardo mentale e l'epilessia. Dei sei casi considerati, quattro avevano presentato un esordio della malattia nell'infanzia, con un disturbo muscolare grave o moderato: si trattava di tre maschi di 16, 21 e 52 anni, con frammento 4q35 rispettivamente di 12, 10 e 13 Kb, e di una femmina di 40 anni, con frammento di 11 Kb. In tutti questi quattro casi era evidente un'ipoacusia neurosensoriale, che si associava a ritardo mentale in tre e, in due di loro, anche ad epilessia. Gli altri due pazienti, con frammento 4q35 di 13 e 12 Kb, presentavano un tipico fenotipo FSHD con esordio di malattia in adolescenza e moderato coinvolgimento muscolare. In questi due casi il disturbo uditivo era lieve, evidenziandosi un'ipo-acusia subclinica, principalmente per le alte frequenze. Nessuno di questi due casi presentava disturbo intel-lettivo o epilessia. I nostri dati sono stati confrontati con quelli di altri 28 casi analoghi, riportati in letteratura. Complessivamente si evidenzia che il fenotipo clinico dei soggetti con ampie delezioni 4q35 (10-13 Kb) è caratterizzato da ipoacusia neuro sensoriale (61 %) prevalente per le alte frequenze e correlabile a patologia cocleare. Inoltre, nei casi con frammenti di 10 e 11 Kb, la FSHD appare manifestarsi con fenotipo distrofico più grave ad esordio infantile e con pre-senza non solo di ipoacusia ma anche di ritardo mentale (92%) e, spesso, di epilessia (58%). Nei pazienti con 13 Kb il fenotipo clinico appare variabile e generalmente senza coinvolgimento cerebrale.

Distrofia miotonica di Steinert: efficacia tra due diverse modalità di ventilazione non invasiva

Patrino V[^], Aiolfi S[^], Chiesa L[^], Villani F*, Pincherle A*, Canioni E*, Morandi L*

Fondazione Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano, Italia, [^]A.O. Ospedale Maggiore di Crema, Rivolta d'Adda, Italia

Sonnolenza diurna, ipercapnia, disturbi respiratori complessi del sonno (SBD) e desaturazioni notturne sono eventi comuni nella distrofia miotonica di Steinert (DM1). Abbiamo valutato in pazienti DM1 l'efficacia di due modalità di ventilazione meccanica non invasiva (NIV), la Pressure support ventilation with continuous Positive Airway Pressure (BiPAP) e l'automated Servo-assisted Ventilation (autoSV), utilizzata per pazienti con respiro tipo Cheyne-Stokes. Metodi. Dopo studio polisonnografico, abbiamo selezionato 12 pazienti DM1, con significativa ipossiemia e SBD complessi. I pazienti sono stati sottoposti per una notte a ventilazione con BiPAP o con autoSV, valutando saturazione media, saturazione massima, periodo di tempo con SaO₂<90% (TC90) e numero di desaturazioni (dips≥3%) all'ora (ODI). Abbiamo inoltre rilevato la preferenza dei pazienti nei confronti delle due modalità di NIV. Abbiamo osservato un

miglioramento significativo della saturazione media, della saturazione massima, del TC90 e dell'ODI con entrambi i tipi di ventilazione, ma nei pazienti trattati con AutoSV il miglioramento degli indici ODI e TC90 è risultato significativamente superiore rispetto a quello indotto con BiPAP ($p < 0,005$). Inoltre la ventilazione con AutoSV è stata preferita dalla maggior parte dei pazienti (10/12). Nei pazienti DM1 con desaturazioni notturne e SDB complessi, la AutoSV sembra essere un'opzione terapeutica migliore del BiPAP.

Miopatia miotubulare X-linked: identificazione di una nuova mutazione nel gene MTM1

Pedemonte M, D'Apice MR, Conte G, Scapolan S, Novelli G, Bruno C, Minetti C

Istituto Giannina Gaslini, Genova; Policlinico Tor Vergata, Roma, Italia

La miopatia congenita miotubulare è una rara patologia X-linked, caratterizzata da ipotonia neonatale, ipostenia e insufficienza respiratoria che determina il decesso nei primi mesi di vita. E' causata dalla mutazione del gene MTM1 localizzato a livello di Xq28, che codifica per una fosfatasi denominata miotubularina. Attualmente sono state descritte circa 200 differenti mutazioni nel gene MTM1, che risultano per la maggior parte delle mutazioni de novo. Riportiamo una nuova mutazione del gene MTM1 in un neonato affetto da miopatia miotubulare X-linked. Primogenito di genitori sani, non consanguinei. Anamnesi familiare negativa per patologie neuromuscolari. Riferiti ridotti movimenti fetali durante la gravidanza. Alla nascita riscontro di ipotonia muscolare generalizzata, assenza di movimentazione spontanea ed insufficienza respiratoria per cui veniva intubato. La biopsia muscolare evidenziava aspetti tipici di miopatia miotubulare. Dai due mesi effettua trattamento di ventilazione non invasiva durante il sonno ed è alimentato tramite gastrostomia endoscopica percutanea (PEG) dai 5 mesi. Attualmente, all'età di 10 mesi, presenta un soddisfacente compenso. L'analisi molecolare del gene MTM1 ha evidenziato una nuova mutazione nell'esone 14, che determina la produzione di una proteina tronca. Tale mutazione non è stata riscontrata all'analisi di 100 cromosomi sani. La madre non è risultata portatrice di tale mutazione confermandone l'origine de novo.

Il “toe-walker”: problema ortopedico o neuromuscolare? Revisione di una casistica in età pediatrica

Pini A*, Donzelli O[^], Ciriaco A*, Zucchini E*, Lampasi M[^], Bettuzzi C[^], Sabatelli P[§], Maraldi NM[°], Mora M^ç, Gualandi F⁺, Ferlini A⁺, Gobbi G*

**Neuropsichiatria Infantile, Ospedale Maggiore, Bologna; ^Ortopedia Pediatrica e °Biologia Cellulare, IOR, Bologna, § IGM,CNR Bologna; ç Istituto Neurologico C.Besta, Milano; + Genetica Medica, Ferrara, Italia*

Quando in un bambino “toe-walker” è presente una retrazione del tendine d'Achille (RTA) le cause

possono essere centrali o periferiche. Tra le periferiche l'RTA può sottendere una malattia neuromuscolare (MNM), ma in letteratura vengono considerate anche forme “idiopatiche”. Allo scopo di identificare possibili fenotipi clinici caratteristici orientativi in ambito miologico, abbiamo revisionato i dati anamnestici, familiari, clinico-evolutivi, CK e, quando disponibili, biotipici muscolari e molecolari, inerenti ad una casistica in età pediatrica di RTA periferico. Sono stati raccolti 41 casi (34 maschi e 7 femmine) di età compresa tra 1a10m e 12aa7 m alla prima osservazione; il follow-up medio è di 4aa. Nella maggiore parte dei casi la RTA era isolata mentre nel 25% si associava a retrazioni in altri distretti. In 4 casi si associava debolezza muscolare (distale in 2 casi risultati affetti da CMT), in 2 lassità articolare. La CK era normale in tutti i casi. Diciotto casi sono stati sottoposti a intervento chirurgico di allungamento tendineo ad una età media di 7aa1m; in 4 di essi la RTA era insorta dopo il cammino autonomo ed era ingravescente. La biopsia muscolare, effettuata in 10 casi, mostrava aspetti miopatici in 4 di essi (predominanza del primo tipo in 2). Da questa revisione emerge l'utilità di effettuare studi prospettici per mettere a punto un protocollo valutativo che evidenzia elementi clinici precoci sensibili a orientare verso una MNM o una forma “idiopatica” di RTA.

OASIS: un'architettura intelligente per la valutazione dell'attività muscolare e la vita indipendente dell'anziano

Pioggia G*, Ricci G[°], Manca L[°], Armato A*, De Rossi D*, Siciliano G[°]

** Centro Interdipartimentale di Ricerca “E. Piaggio”, °Dipartimento di Neuroscienze, Università di Pisa, Italia*

OASIS (Open architecture for Accessible Services Integration and Standardisation, ICT-2007.7.1, ICT & Ageing n. 215754) è un progetto integrato appena finanziato dalla Comunità Europea nell'ambito del VII Programma Quadro. OASIS ha come obiettivo lo sviluppo di un'architettura multisensoriale pilotata da un'ontologia in grado di integrare nuovi prototipi per la valutazione e la stimolazione della vita indipendente e l'invecchiamento attivo, come anche dei processi riabilitativi. Ciò consentirà di prolungare l'autonomia personale e la partecipazione attiva nella società. La principale innovazione introdotta dall'Università di Pisa in questa nuova architettura riguarda lo sviluppo di un sistema intelligente non intrusivo per la rivelazione ed analisi delle attivazioni muscolari e dei movimenti coinvolti nella cinematica e dinamica della cintura pelvica durante le transizioni da ed alla posizione ortostatica. Il sistema si basa su sensori inerziali e di attività elettromiografica la cui sezione elettronica di processing e comunicazione senza fili è integrata all'interno di una cintura. Un modello accurato del sistema fisiologico consentirà l'integrazione, la correlazione e l'analisi delle informazioni muscolari. Questi dati processati

costituiranno un ingresso all'ontologia di OASIS che consentirà una valutazione clinica dell'attività muscolare e della vita indipendente pianificando le attività di neuroriabilitazione.

La terapia cellulare con Mini-Agrina migliora il fenotipo di modelli murini di Distrofia Muscolare Congenita

Porrello E*, Capotondo A[^], Triolo D*, Sampaolesi M[°], Brunelli S[°], Comi G*, Ruegg M§, Cossu G[°], Biffi A[^], Quattrini A*, Previtali SC*

*Dipartimento di Neurologia e INSPE, [^]TIGET, [°]SCRI, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia; §Biozentrum, Università di Basilea, Svizzera

La distrofia muscolare congenita (DMC) è caratterizzata da atrofia ed ipostenia muscolare, neuropatia ed anomalie del sistema nervoso centrale che causano una severa e progressiva disabilità. La forma più frequente è causata da mutazioni del gene LAMA2, che codifica per la catena alfa-2 della laminina-2, la principale laminina presente nella lamina basale di molti tessuti. Sebbene siano note le caratteristiche cliniche, le cause genetiche, ed i meccanismi patogenetici che causano la progressiva degenerazione del tessuto neuromuscolare della DMC, non si è ancora in grado di modificarne il decorso o rallentare i processi degenerativi. Studi recenti hanno dimostrato che incrociando modelli murini di DMC con topi transgenici che esprimono una proteina di sintesi detta mini-agrina, capace di formare un ponte tra le cellule muscolari ad altre laminine presenti nella loro lamina basale, si ottiene un miglioramento del fenotipo muscolare. Tuttavia, questo approccio non è praticabile nell'uomo. Invece, l'utilizzo della terapia cellulare potrebbe essere di più facile traslazione nella pratica clinica. Scopo di questo lavoro è di verificare se sia possibile migliorare il fenotipo di topi con DMC trattandoli con cellule che sintetizzano e rilasciano nel tessuto malato la mini-agrina. A tale scopo, cellule staminali note come mesoangioblasti sono state ingegnerizzate per esprimere la mini-agrina. Le cellule sono in grado in vitro di secernere ampie quantità di mini-agrina. Le stesse cellule sono state iniettate endovena in topi affetti da DMC migliorandone il fenotipo e l'istologia muscolare.

Malattia di Chanarin-Dorfman: aspetti clinici, genetici e neuroradiologici di un caso adulto seguito per 25 anni.

Portaro S*, Gaeta M[°], Bruno C[^], Musumeci O*, Rodolico C*, Cassandrini D[^], Vita G*, Toscano A*

*Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Psichiatriche ed Anestesiologiche, Università degli Studi di Messina; [^]Unità di malattie muscolari e neurodegenerative, Istituto "G. Gaslini", Università di Genova, Genova; [°]Dipartimento di Scienze Radiologiche, Università degli studi di Messina, Italia

La malattia di Chanarin-Dorfman (CDD) è una rara malattia autosomica-recessiva (circa 50 i casi fino ad ora descritti), caratterizzata da ittiosi, epatomegalia,

disturbi del sistema nervoso centrale e miopatia, prevalentemente presente nelle popolazioni mediterranee. Riportiamo qui il caso di una paziente siciliana, nata da genitori consanguinei (cugini di I grado), con insorgenza a 41 anni, di debolezza muscolare progressiva ai 4 arti e crampi muscolari agli arti inferiori. Presentava inoltre ittiosi lamellare, prevalentemente distale agli arti inferiori, e modica epatomegalia. L'esame obiettivo evidenziava un'andatura steppante, iperlordosi lombare, segno di Gowers ed atrofia muscolare dei quattro arti con riflessi osteotendinei fiacchi agli arti. Il dosaggio serico di CK e mioglobina era aumentato. L'esame dello striscio di sangue evidenziava, nel citoplasma di neutrofili, monociti ed eosinofili, vacuoli contenenti goccioline lipidiche (anomalia di Jordan). La biopsia muscolare presentava una abnorme presenza di vacuoli ripieni di goccioline lipidiche. Il dosaggio della carnitina muscolare era marcatamente ridotto. All'età di 67 anni, la paziente non deambulava più e presentava una notevole e diffusa atrofia muscolare. Una RMN dei muscoli del collo, del tronco e degli arti inferiori, (eseguita mediante tecnica GE in fase ed in opposizione di fase nelle sequenze T1 pesate), confermava una marcata atrofia muscolare con sostituzione adiposa e risparmio dei muscoli masticatori, cervicali, psoas ed otturatori interni ed esterni. Lo studio, eseguito con le suddette sequenze, riusciva inoltre a valutare la presenza di lipidi intracellulari, suggerendo così una tecnica preferenziale per la precoce diagnosi di una miopatia da accumulo di lipidi. Lo studio molecolare del gene CGI-58 ha evidenziato la mutazione IVS4-1G>A in omozigosi; tale mutazione causava a livello di cDNA uno skipping degli esoni 4 e 5. La paziente è deceduta all'età di 69 anni, dopo ripetuti episodi di coma metabolico dovuto ad iperammoniemia. Pertanto, i nostri dati evidenziano la rarità della malattia di Chanarin-Dorfman, confermata dalla presenza di una mutazione del gene CGI-58, e suggeriscono, in casi sospetti di miopatia da accumulo di lipidi, l'utilizzo di particolari metodiche RMN per il muscolo scheletrico per un migliore approccio diagnostico.

La Rete Regionale del Piemonte per la gestione dei pazienti con insufficienza respiratoria insorta in età evolutiva

Racca F*, Bignamini E[^], Maspoli M[°], Ranieri VM*

*Dipartimento di Anestesia e Rianimazione, Università di Torino, ASO S.Giovanni Battista-Molinette, Torino; [^]S.C. Pneumologia ASO OIRM S.Anna, Torino; [°]Assessorato alla Sanità- Regione Piemonte, Torino, Italia

I progressi nel campo della gestione clinica (ventilazione meccanica domiciliare, assistenza alla tosse, chirurgia della scoliosi, etc.) hanno migliorato in modo significativo la qualità di vita, la morbilità e la mortalità dei bambini che sviluppano insufficienza respiratoria (IR) durante l'età evolutiva, soprattutto di quelli con patologia neuromuscolare. A partire dal

2003 la Regione Piemonte ha avviato un processo di organizzazione dell'attività di assistenza all'IR attraverso la creazione di un sistema regionale "a rete". La Rete si basa sul principio della presa in carico multidisciplinare e continua dell'individuo e consente l'ottimizzazione delle risorse umane e materiali dedicate, contribuendo a migliorare i percorsi di diagnosi e cura. In antitesi col modello che prevede la presenza di un unico o pochi centri regionali, la Rete si espande in tutto il territorio coinvolgendo gli Ospedali Provinciali e Periferici, il 118 e la Medicina del Territorio. Sono stati designati i Centri Regionali di Riferimento³⁻⁴ e successivamente sono state individuate all'interno di ciascuna area le Unità Operative in grado ottemperare alle necessità di cura dei pazienti con IR insorta in età evolutiva sia nella fase di stabilità clinica che di riacutizzazione, sia per le cure domiciliari che per le cure ospedaliere.

Immunoglobuline endovena e Miastenia Gravis: indicazioni in acuto ed in cronico

Ricciardi R*, Maestri M*, Cafforio G*, Lucchi M°, Mussi A°, Murri L*

*Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze e °U.O. Chirurgia Toracica, Dipartimento Cardio-toracico, Università di Pisa, Italia

La Miastenia Gravis (MG) è una malattia neuromuscolare di tipo autoimmunitario caratterizzata da una grave esauribilità muscolare che peggiora dopo l'esercizio fisico e migliora con il riposo. In questi ultimi anni, la Plasmaferesi e le Immunoglobuline e.v. hanno rappresentato due importanti presidi terapeutici che hanno radicalmente cambiato, in alcune particolari condizioni, l'evoluzione della malattia. Obiettivo dello studio è stato di raccogliere i dati clinici di 170 pazienti miastenici (103 F/ 67 M) seguiti nel nostro ambulatorio sottoposti a trattamento terapeutico con Ig e.v., per evidenziare sia maneggevolezza e sicurezza del presidio terapeutico sia le diverse possibili indicazioni. In tutti i pazienti, le immunoglobuline sono state utilizzate ad un dosaggio di 0.4 g/Kg/die per 5 giorni consecutivi. Il trattamento è stato effettuato in acuto in 58 pazienti, 47 per crisi miastenica (gruppo 1) e 11 come preparazione alla timectomia (gruppo 2); in questi pazienti la valutazione, mediante la scala QMG (Quantitative Myasthenia Gravis Score) della MGFA è stata effettuata prima del ciclo di IG e dopo 5 giorni. 112 pazienti sono stati sottoposti cronicamente a cicli mensili di immunoglobuline per almeno un anno; in questi pazienti sono state considerate le valutazioni a 6 e 12 mesi. All'interno di questo gruppo, 43 sono stati trattati per insufficiente risposta alle altre terapie (gruppo 3), 23 per ridurre la dose dello steroide (gruppo 4), 14 per sintomi oculari resistenti (gruppo 5), 32 in forme severe sieronegative (group 6). Nei pazienti trattati acutamente sono stati ottenuti miglioramenti significativi del quadro clinico sia nel gruppo 1 che 2 ($p<.01$). Anche i pazienti sottoposti ad una terapia cronica hanno evidenziato un miglioramento clinico

($p<.01$). Non sono stati riscontrati seri effetti collaterali nella popolazione esaminata. I nostri risultati confermano la tollerabilità e l'efficacia della terapia acuta con immunoglobuline nella crisi miastenica e come prepa-razione alla timectomia. Inoltre, le Ig e.v. possono esse-re un utile strumento nel trattamento cronico di specifiche condizioni nella MG.

Sintesi di distrofina nel modello murino mdx dopo somministrazione sistemica di una bassa dose di oligoribonucleotide antisense coniugato con nuove nanoparticelle cationiche.

Rimessi P*, Fabris M*, Sabatelli P*[^], Braghetta P°, Bassi E*, Spitali P*, Vattemi G§, Tomelleri§, Mari Lç, Perrone D+, Medici A+, Neri M*, Bovolenta M*, Martoni E*, Maraldi N[^], Bonaldo P°, Gualandi F*, Merlini L*, Tondelli L**[^], Sparnacci K^{^^}, Caputo A°, Laus M^{^^}, Ferlini A*

*Dip. di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sez. di Genetica Medica, Università di Ferrara, Ferrara; ^NGM-C.N.R., Unità di Bologna, c/o IOR, Bologna; °Dip. di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova, Padova. §Dip. di Scienze Neurologiche, Sez. Di Neurologia Clinica, Università di Verona, Verona; çDip. di Chimica, Università di Ferrara, Ferrara; +Dip. di Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara, Ferrara; **ISOF, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna; ^^Dip. di Scienze Ambientali INSTM, Università del Piemonte Orientale, Alessandria, Italia

L'approccio terapeutico di "exon skipping" mediante oligonucleotidi antisense (AON) consente la modulazione di un'elevata percentuale di mutazioni responsabili di distrofia muscolare di Duchenne (DMD), ristabilendo la sintesi di distrofina. Nel presente lavoro dimostriamo che la somministrazione intraperitoneale nel modello murino mdx di una piccola quantità (2.7 mg/Kg) di AON, verso il sito donatore di splicing dell'esone 23, complessato con nanoparticelle cationiche di polimetilmetacrilato denominate T1, induce il ripristino della sintesi di distrofina in diversi distretti muscolari, incluso il cuore. La stessa quantità di AON somministrato come tale non produce nessun effetto misurabile sull'espressione di distrofina. Nel muscolo scheletrico è stato possibile evidenziare la sintesi di distrofina sia mediante analisi immunoistochimica che in western-blot, mentre a livello cardiaco solo in immunoistochimica. E' stata inoltre condotta un'estesa analisi trascrizionale del gene distrofina, mediante Real Time PCR, che ha rivelato nel topo mdx un profilo trascrizionale muscolo-specifico, e un aumento dei livelli trascrizionali in seguito al trattamento con complessi AON-T1. I risultati ottenuti suggeriscono che le nanoparticelle T1 costituiscono un promettente veicolo per il trasporto di AON in vivo, in grado di raggiungere tutti i distretti coinvolti nella DMD e di potenziare l'effetto dell'AON, consentendo la somministrazione di piccolissime quantità.

Espressione di ANT1 e attivazione della via RAGE-NF-kB nella miosite con corpi inclusi

Rodolico C*, Cianci V*, Macaione V[^], Aguenouza M*, Mazzeo A*, Ciranni A*, Lanzano N*, De Pasquale MG*, Vita GL*, Toscano A*, Vita G*

*Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Psichiatriche ed Anestesiologiche, AOU “G. Martino”, Messina;

[^]Dipartimento di Biochimica, Fisiologia e Scienze della Nutrizione, AOU “G. Martino”, Messina, Italia

Nella miosite con corpi inclusi (s-IBM) possono essere evidenti anomalie mitocondriali. Una riduzione di ANT1, la più abbondante proteina della membrana mitocondriale interna, è stata associata alla produzione di radicali liberi (ROS) nel muscolo scheletrico. E' stato inoltre dimostrato che i prodotti terminali di “glicazione” (advanced glycation end products: AGEs) ed i loro recettori (RAGE), sono coinvolti nel meccanismo proinfiammatorio di alcune miopatie in risposta allo stress ossidativo. Scopo del lavoro è stato quello di studiare alcuni markers di stress ossidativo, ANT1 e la via RAGE-NF-kB nella s-IBM con l'intento di verificare un loro possibile ruolo nella patogenesi di questa malattia. Su tessuto muscolare di 5 pazienti con s-IBM, di 5 con polimiosite (PM) e di 5 controlli sani sono stati eseguiti i seguenti studi: immunoistochimica per NF-kB attivato; electrophoretic mobility shift assay di NF-kB DNA binding activity; Western blot di ANT1 e RAGE; dosaggio di perossido d'idrogeno, perossidasi e glutatione perossidasi (GPx). Un aumentato staining di NF-kB, un'aumentata attività di NF-kB-DNA binding, un aumento dell'espressione dei RAGE e di GPx è stato riscontrato nei pazienti con s-IBM e PM, mentre una riduzione di ANT1 era evidente nella s-IBM rispetto ai controlli ed ai pazienti con PM (P<0.01). La riduzione di ANT1, l'elevata attività di GPx e l'attivazione della via RAGE-NF-kB riflettono un'alterazione del sistema ossido-riduttivo nella s-IBM.

Miopatia nemalinica: dal quadro istomorfologico alla correlazione con il gene “acta1”

Romano C, Cassandrini D, Battaglini C, Scoto MC, Rodolico C, Falsaperla R, Minetti C

Azienda Ospedaliera - Università Vittorio Emanuele, UO di Pediatria, Genova, Italia.

La Miopatia Nemalinica è una patologia primitiva muscolare, caratterizzata dalla presenza nelle fibre muscolari di inclusioni conosciute come “rods” o corpi nemalinici, di colore rosso-violaceo, evidenziabili tramite la tricromia di Gomori. Clinicamente si distinguono forme precoci e forme ad esordio più tardivo. La classificazione clinico-genetica proposta dal Centro Europeo Malattie Neuromuscolari, prevede la distinzione in 7 forme trasmesse con carattere autosomico recessivo (AR), autosomico dominante (AD) o forme sporadiche, tutte correlate ad uno specifico difetto proteico. Le proteine coinvolte sono la α -tropomiosina (2-3%), la nebulina (70%), B-tropomiosina (<1%), α -Actina (15-25%), Troponina T1 (<1%), Cofilina 2 (rara). In collaborazione con il reparto di Malattie Neurodegenerative e Neuromusco-

lari dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova abbiamo selezionato sette pazienti affetti da Miopatia Nemalinica (NM). La diagnosi di ogni paziente è stata ricavata da una revisione totale dei dati clinici e strumentali, e confermata dalla biopsia muscolare. Successivamente dopo aver posto diagnosi di Miopatia Nemalinica, in tutti e sette i pazienti sono state eseguite indagini genetico-molecolari, su RNA totale estratto da muscolo congelato, per evidenziare mutazioni a carico del gene ACTA1. L'analisi genetico-molecolare ha evidenziato la presenza di mutazioni del gene ACTA1 in due dei pazienti esaminati. Il primo paziente presentava la sostituzione del nucleotide A con il nucleotide G in posizione 235 della sequenza codificante del gene ACTA1 (c.235-A>G) allo stato eterozigote. Tale mutazione determina il cambio dell'amminoacido treonina in alanina in posizione 77 della proteina (T 77A). La mutazione identificata è una mutazione vera, poiché essa è stata esclusa da 96 controlli normali, non è un polimorfismo. I genitori del paziente e la sorella hanno eseguito analisi genetico-molecolare per il gene ACTA1 risultando non affetti. Entrambi i genitori sono wild-type. Il secondo paziente presentava una delezione (mancanza di amplificazione durante la reazione di PCR), che interessa i primi frammenti del gene, è in corso lo studio del DNA genomico per evidenziare la causa di mutazione che può essere correlata ad una mutazione intronica o in un sito di splicing. I nostri 2 casi ACTA1 positivi, hanno presentato un esordio neonatale ed un ritardo dello sviluppo motorio. Entrambi i pazienti presentano un decorso clinico stazionario nel tempo. Dal nostro studio si evince che il quadro clinico esordisce usualmente alla nascita e si presenta successivamente con ritardo dello sviluppo motorio. Da segnalare che sono stati riportati casi di delezione del gene ACTA1 che non determinavano la presenza di Miopatia nemalinica, ma di un'altra forma di Miopatia congenita denominata “disproporzione di fibre” (CFTD). Dall'analisi genetico-molecolare dei sette casi studiati, si evince che le mutazioni a carico del gene ACTA1 codificante la proteina actina facente parte dei filamenti sottili, coinvolge circa il 14% dei pazienti con miopatia nemalinica. Inoltre non è possibile una correlazione tra il numero dei rods, la mutazione del gene ACTA1 e il quadro clinico. La nostra esperienza dimostra che i nostri casi di MN da mutazione dell'ACTA1 presentano un fenotipo classico infantile ed il decorso clinico è stazionario.

Alterazioni morfologiche dei capillari sanguiferi del muscolo scheletrico in due pazienti affetti da Miopatia Miosclerotica

Sabatelli P*, Martoni E[^], Grumati P^o, Zamparelli A*, Squarzoni S*, Urciuolo A^o, Ferlini A[^], Gualandi F[^], Stallcup W.B[§], Bonaldo P^o, Merlini L[^]

*IGM-CNR, c/o IOR, Bologna; [^]Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Genetica Medica, Università di Ferrara, Ferrara; ^oDipartimento di Istologia,

Microbiologia e Biotechnologie Mediche, Università di Padova, Padova; §Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, California, USA

Il collagene VI è una componente della matrice extracellulare che avvolge le fibre muscolari scheletriche ed i vasi sanguiferi, dove interagisce con proteine di adesione come il fattore von Willebrand, il platelet derived growth factor (PDGF) e recettori della membrana cellulare come le integrine ed il proteoglicano NG2. Abbiamo studiato le biopsie muscolari di due fratelli affetti da miopatia miosclerotica, causata da mutazione omozigote nel gene COL6A2 (Q819X). Mediante indagine immunostochimica, il collagene VI risultava ridotto a livello della membrana basale delle fibre muscolari ed assente nei capillari sanguiferi. Lo studio ultrastrutturale evidenziava aspetti di duplicazione ed ispessimento della lamina densa, associati ad un aumento del numero dei periciti. Contrariamente a quanto aspettato, NG2, normalmente espresso dai periciti, appariva marcatamente ridotto, mentre l'actina del muscolo liscio (α -SMA) era aumentata. Tali alterazioni vascolari erano confermate nel diaframma del topo NG2^{-/-}, mentre erano assenti nel muscolo di quattro pazienti affetti da Distrofia Muscolare Congenita di Ullrich e del topo Col6a1^{-/-}. Questo studio evidenzia la presenza di alterazioni vascolari peculiari in pazienti affetti da miopatia miosclerotica. L'alterata espressione di NG2 può influire sulla proliferazione e sul fenotipo cellulare dei periciti. Determinate mutazioni del collagene VI possono alterare particolari compartimenti tissutali e specifiche funzioni.

IperCKemia asintomatica come esordio di Miopatia con corpi inclusi

Sampaolo S*, Diodato D*, Toscano A[^]; Rodolico C[^]; Simonetti M*; Broccolini A^o; Farina O*; Di Iorio G*

**Dipartimento di Scienze Neurologiche, Seconda Università di Napoli; ^Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Psichiatriche ed Anestesiologiche, Università di Messina; °Dipartimento di Neurologia, Policlinico "A. Gemelli", Roma, Italia*

Le miopatie con corpi inclusi sono patologie muscolari di raro riscontro, con fenotipo clinico prevalentemente distale, risparmio dei muscoli quadricipiti e vacuoli "rimmed" alla biopsia muscolare. Tali patologie sono spesso legate a mutazioni del gene UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE). Descriviamo due fratelli di 60 e 55 anni, con anamnesi negativa per patologie neuromuscolari, giunti alla nostra osservazione per il riscontro di moderato aumento dei valori di CK sierica (4-6 volte la norma). L'obiettività neuro-muscolare era normale, l'EMG evidenziava un aumento dei potenziali polifasici. Alla biopsia muscolare erano presenti, in entrambi i casi, ampi vacuoli subsarcolemmali, fosfatasi-acida positivi, contenenti fini granuli basofili alla tricromica di Gomori, lieve aumento del glicogeno e vacuoli con aspetto "rimmed". Numerose fibre mostravano positività per gli anticorpi anti-neurofilamenti tau-fosforilati

SMI-31. La determinazione della maltasi acida e dell'attività deramificante non evidenziavano deficit biochimici. Il riscontro di aggregati SMI-31 positivi in una miopatia vacuolare è suggestivo di "Miopatia ereditaria con corpi inclusi". Per la rarità di questa patologia e per l'inusuale presentazione clinica (iperCKemia asintomatica), il nostro caso rappresenta un interessante contributo all'ulteriore definizione dello spettro fenotipico della miopatia con corpi inclusi. E' in corso lo studio ultrastrutturale e l'analisi molecolare del gene GNE.

Disproporzione congenita del tipo di fibra e cardiomiopatia non compatta associate ad insulino-resistenza

Sampaolo S*, Diodato D*, Varone A^o; Limongelli G[^]; Simonetti M*; Calabrò P[^]; Calabrò R[^]; Di Iorio G*

**Dipartimenti di Scienze Neurologiche e ^Cardiotoraciche e Respiratorie, Seconda Università di Napoli; °Dipartimento di Neuroscienze, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli, Italia*

Descriviamo i dati più recenti circa una paziente, già presentata in altra sede, affetta da disproporzione congenita delle fibre (CFTD) e cardiomiopatia non compatta (NC). Primogenita di genitori con consanguineità e diabete mellito nella linea materna, presentava alla nascita difficoltà di suzione, ipoglicemia e displasia congenita dell'anca. A 17 mesi riceveva diagnosi di CFTD (EMG, biopsia) e di NC (ecocardiografia, RM). Periodici controlli evidenziavano un'ipostenia progressiva dei muscoli dei cingoli e di quelli prossimali, scoliosi, CK costantemente nella norma, steatosi con assottigliamento dei muscoli degli arti inferiori alla RM ed un'insufficienza ventricolare sinistra (frazione di eiezione 40%) associata a sindrome del QT lungo. A 10 anni, dopo il riscontro di diabete tipo II nel ramo materno (cuginetto di 5 anni) praticava curva da carico di glucosio che mostrava un'insulino-resistenza. La paziente è deceduta improvvisamente ad 11 anni. L'associazione CFTD/NC suggerisce una co-mune patogenesi delle due patologie. L'analisi mutazionale del gene ACTA1, coinvolto in entrambe, è comunque risultata negativa. L'insulino-resistenza riscontrata rende SEPNI, di cui è in corso l'analisi, il principale gene candidato anche alla luce del ruolo che il metabolismo insulinico sembra svolgere nello sviluppo del muscolo scheletrico e cardiaco.

Alterazioni proteine tau liquorali e quoziente intellettivo (QI) nella Distrofie Miotoniche di tipo 1 (DM1) e di tipo 2 (DM2)

Sansone V*, Gandossini S*, Cotelli M[^], Calabria M[^], Galimberti D^o, Fenoglio C^o, Scarpini E^o, Meola G*

**IRCCS Policlinico San Donato, Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Neurologia; ^Lab Neuropsicologica, IRCCS Osp. S. Giovanni di Dio FbF, Brescia; °IRCCS Policlinico Milano, Dipartimento di Neurologia, Università degli Studi di Milano, Italia*

La significatività clinica delle alterazioni delle proteine tau dimostrata nella DM1 non è chiara ed è ancora da dimostrare nella DM2. Obiettivi. i) Determinare le proteine liquorali tau nei pazienti con DM1 e DM2; ii) Stabilire se i livelli di proteine tau correlano con i livelli di QI. 24 DM1 (50.3 ± 12.2 anni; CTG:600-800n) e 9 DM2 (56.3 ± 13.1 anni) sono stati sottoposti a: i) bilancio muscolare (scala MRC); ii) Wais-R (QI); iii) determinazione liquorale di tau totale (t-tau), tau fosforilata (p-tau), ed Abeta(1-42) (ELISA, Innogenetics, Belgio). I risultati sono stati confrontati con 16 controlli sani di pari età, sesso e grado di educazione. I livelli medi di t-tau e p-tau sono significativamente diversi nei DM1 rispetto ai controlli ($p < 0.05$). I livelli medi di t-tau sono superiori alla norma solo in 6/24 DM1. I livelli di p-tau sono superiori alla norma in quasi tutti i DM1 (22/24, 91%), ma solo in 6/9 DM2 (66%). 2/24 DM1 (12.5%) e 1/9 DM2 (22%) hanno valori di QI < 79 e 1/24 DM1 e 1/9 DM2 hanno QI < 69 . I livelli di tau ed i valori di QI sono indipendenti dal grado di ipostenia. Questi dati preliminari confermano ulteriormente che l'interessamento cognitivo nelle forme adulte di DM è indiscusso. Sottolineano tuttavia che è necessario correlare i dati con aspetti neuropsicologici maggiormente compromessi (funzioni visuo-spaziali, frontali) e con il grado di atrofia corticale e sofferenza della sostanza bianca mediante studi quantitativi di RM.

Il rischio aritmico nella Distrofia Miotonica di tipo 2: studio osservazionale

Sansone V*, De Ambroggi G[^], Briganti S[^], Panzeri M*, De Ambroggi L[^], Meola G*

*Dipartimento di Neurologia e ^Cardiologia, IRCCS Policlinico San Donato, Università degli Studi di Milano, Italia

Il grado di compromissione del sistema di conduzione cardiaco nella distrofia miotonica di tipo 2 (DM2) rispetto alla distrofia miotonica di tipo 1 (DM1) non è definito. Obiettivi. Valutare la frequenza e severità dei disturbi di conduzione nella DM2 rispetto alla DM1. Metodi: E' stato effettuato uno studio retrospettivo su 64 pazienti DM2 (56.6 ± 12.8 anni) e 126 pazienti DM1 (46.8 ± 12.3 anni) valutando: i) bilancio muscolare (scala MRC); ii) ECG; iii) ECG Holter; iv) Ecocardiogramma; v) studio elettrofisiologico (SEF). Risultati: i) 2/64 pazienti con DM2 vs 39/126 con DM1 hanno presentato sincope. In 1 DM1 è stato l'esordio della malattia; ii) E' stato posizionato il PM in 2/62 DM2 vs 15/126 DM1; iii) 1 famiglia su 38 DM2 vs 5 su 55 DM1 hanno storia familiare positiva per morte improvvisa; iv) Nessun paziente con DM2 è stato sottoposto a SEF vs 4 pazienti con DM1. I dati del nostro studio suggeriscono che il rischio di aritmie gra-vi è minore nella DM2 rispetto alla DM1. Le pur ancora rare segnalazioni di disturbi di conduzione nella DM2, e le similitudini cliniche e patogenetiche tra la DM1 e la DM2, sottolineano la necessità di applicare

un protocollo specifico per valutare il rischio aritmico anche nella DM2.

Cardiomiopatia dilatativa e malattia del secondo motoneurone come inusuale fenotipo della mutazione del DNA mitocondriale A8344G (MERRF)

Scarlato M, Lamantea E, Carrara F, Lacerenza M, Comi G, Zeviani M, Quattrini A, Previtali SC

Dipartimento di Neurologia e INSPE, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano; U.O. Neurogenetica Molecolare – Fondazione IRCCS Istituto Neurologico “C. Besta”, Milano, Italia

Descriviamo un paziente di 60 anni che giungeva a valutazione neurologica in quanto affetto da oltre quattro anni da ipostenia sfumata a livello della muscolatura del capo, e più marcata a livello degli arti superiori con distribuzione disto>prossimale, con associata marcata atrofia della muscolatura intrinseca delle mani. Presentava inoltre fascicolazioni diffuse alle braccia, sindrome disventilatoria di tipo misto e riferiva disfagia per i liquidi. Non deficit sensitivi. Presso altro Ospedale era stata posta diagnosi di amiotrofia bulbo-spinale, poi non confermata geneticamente. Gli esami ematochimici evidenziavano un lieve aumento delle CK mentre l'EMG mostrava un quadro di denervazione cronica con associati segni di fibrillazione, Jasper e fascicolazioni. Il paziente era noto per cardiomiopatia dilatativa e fibrillazione atriale (trattata con amiodarone) che aveva causato 6 anni prima un ictus ischemico emisferico sinistro su base embolica, che non aveva lasciato sostanziali esiti, e carcinoma uroteliale papillare, trattato con istillazioni endovesicali. Durante la degenza, la presenza all'ENG di una lieve neuropatia sensitivo-motoria assonale, inizialmente imputata a tossicità da amiodarone, la persistenza dei valori alterati di CK, l'estensione dell'ipostenia alla muscolatura prossimale, e la cardiomiopatia dilatativa, suggerivano l'esecuzione di una biopsia muscolare che mostrava un quadro miopatico con numerose fibre “ragged red” e numerose fibre prive di reattività per la citocromo c ossidasi. L'analisi molecolare del DNA mitocondriale mostrava la presenza di una mutazione A8344G, normalmente descritta nelle forme MERRF.

Delezioni multiple del DNA mitocondriale in pazienti con ritardo mentale

Scuderi C, Borgione E, Castello F, Elia M, Vitello GA, Savio M, Di Blasi F, Pettinato R, Musumeci SA

Istituto di Ricerca e Cura a carattere scientifico per il Ritardo Mentale e l'Involuzione Cerebrale “OASI MARIA SS.”, Troina (EN), Italia

Le delezioni multiple del DNA mitocondriale (mtDNA) possono essere a trasmissione autosomica dominante o recessiva e sono secondarie a mutazioni nucleari (ANT1, Twinkle, e POLG); si associano generalmente all'oftalmoplegia esterna progressiva (PEO), ma possono essere presenti segni aggiuntivi

quali cataratta, sordità, polineuropatia, atassia, depressione e parkinsonismo. I fenotipi più complicati, comprese gravi forme infantili, sono descritti particolarmente nei casi con mutazioni del gene POLG. Abbiamo sviluppato un protocollo basato sulla tecnica della long PCR, che ci permette di amplificare l'intero mtDNA e di identificare la presenza di delezioni o duplicazioni del mtDNA. Sono stati sottoposti a tale studio un gruppo di 36 pazienti con ritardo mentale (RM) e segni clinici suggestivi di malattia mitocondriale. Sono state identificate delezioni multiple in 6 pazienti appartenenti a 4 famiglie distinte. Tutti i soggetti avevano altri familiari affetti, con o senza RM. Le manifestazioni cliniche aggiuntive comprendevano, in varia associazione, anomalie oculari, dismorfismi, epilessia, atassia, miopia, tetraparesi spastica, episodi stroke-like e, in uno dei familiari, una malattia demielinizzante simulante la sclerosi multipla. I risultati del nostro studio ampliano lo spettro fenotipico associato a delezioni multiple del mtDNA e suggeriscono che la ricerca di riarrangiamenti del mtDNA deve essere considerata nella diagnostica etiopatogenetica del RM.

La Distrofia Muscolare Progressiva dei Cingoli LGMD2H, da mutazioni in TRIM32, descritta negli Hutteriti, è presente anche in Sud-Europa

Scutifero M*, Saccone V[^], Di Gregorio MG*, Ventriglia VM[^], Passamano L*, Cecio MR*, Piluso G[^], Aurino S[^], Canki-Klain N[°], Nigro V[^], Politano L*

*Servizio di Cardiomiologia e Genetica Medica e Scuola di Specializzazione in Genetica Medica; [^]Dipartimento di Patologia Generale, Seconda Università di Napoli; [°]Dipartimento di Neurologia, Università di Belgrado, Croatia

La Distrofia Muscolare dei Cingoli 2H (LGMD2H) è una miopia autosomica recessiva ad andamento benigno, descritta per la prima volta nel 1976, nella popolazione Hutterite Brethren, un isolato genetico e religioso del Nord America. Il fenotipo clinico è estremamente variabile, includendo sia soggetti completamente asintomatici, ma con valori di CK fino a 15 volte il valore massimo normale, sia soggetti con evidente coinvolgimento muscolare, sotto forma di astenia, dolore localizzato ai muscoli del dorso e del collo, facile affaticabilità. Il gene responsabile della LGMD2H, denominato TRIM32 (TRipartite-Motif-containing gene), è stato mappato nel 1998 sul braccio lungo del cromosoma 9 (9q31-q33); nel 2002 fu identificata la mutazione causativa negli Hutteriti i quali mostravano tutti in omozigosi la variante D487N, che sostituisce l'aspartato con l'asparagina in posizione 487. In questo contributo viene descritto il fenotipo dei primi 5 casi di LGMD2H, associati a mutazioni nel gene TRIM32, riscontrate in pazienti non Hutteriti provenienti dall'Italia meridionale (4) e dalla Croazia (1). La deriva genetica di tali mutazioni e le caratteristiche fenotipiche utili per sospettare la diagnosi saranno analizzate e discusse.

Terapia enzimatica sostitutiva nella Glicogenosi tipo II dell'adulto

Semplicini C*, Filosto M[^], Tonin P[°], Codemo V*, Bello L*, Pegoraro E*, Angelini C*

*Centro per le malattie neuromuscolari, dip.to Neuroscienze, Università di Padova; [^]Clinica Neurologica, Ospedale Universitario "Spedali Civili", Brescia; [°]Clinica Neurologica, Università di Verona

La Glicogenosi tipo II dell'adulto è una rara malattia da accumulo lisosomiale causata dalla riduzione dell'enzima alfa-glucosidasi acida. La terapia enzimatica sostitutiva è stata recentemente approvata dall'EMA. Gli scopi di questo studio sono stabilire un protocollo di valutazione clinica che descriva quantitativamente la progressione della malattia e di valutare l'efficacia e la tollerabilità della terapia enzimatica in uno studio pilota. Il protocollo da noi istituito include prove di funzionalità motoria, prove di funzionalità respiratoria in posizione seduta e supina, e studio della qualità di vita. Sono stati trattati con alfa-glucosidasi acida ricombinante, Myozyme, undici pazienti, di età compresa tra 32 e 67 anni, per un periodo compreso tra 3 e 20 mesi. Il protocollo di valutazione clinica è risultato affidabile nel descrivere quantitativamente l'evoluzione clinica. I pazienti trattati con Myozyme hanno mostrato lieve e variabile miglioramento delle capacità motorie, misurato mediante MRC e Six-Minute Walk Test, e scarsi o nulli benefici del profilo respiratorio, misurato tramite spirometria (FVC). Un paziente ha interrotto la terapia dopo 3 mesi per una moderata reazione avversa (edema facciale, parestesie periorali e tachicardia e reazione cutanea durata circa 2 mesi). Questi dati suggeriscono che i migliori risultati clinici possano attendersi dai pazienti inizialmente meno compromessi.

Programma di screening respiratorio in pazienti neuromuscolari

Serradori M*, Carlesi C[^], Fiorenza D[°], Carpenè N*, Strambi S*, Falorni M[^], Piazza S[^], Vitacca M[°], Siciliano G[^], Ambrosino N*

*U.O. Pneumologia; [^]Neurologia AOUP, Pisa; [°]Divisione Pneumologia Fondazione Maugeri IRCCS Lumezzane

La compromissione respiratoria è un fattore prognostico negativo nelle malattie neuromuscolari (MN). Abbiamo reclutato 203 pazienti con MN, 95 con distrofia muscolare (25 Duchenne/Becker, 34 Steinert, 5 Distrofia dei cingoli, 31 altre) e 56 con Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) (età media 62 ± 12 anni; 38 maschi e 18 femmine; 18 con forma bulbare, 18 pseudopolineuropatica e 20 classica). I pazienti sono stati valutati alla diagnosi e ad intervalli di 3-6 mesi, attraverso ega, spirometria, pressioni inspiratorie ed espiratorie statiche (MIP e MEP); inoltre, per la determinazione del grado di disabilità, sono state utilizzate la scala ALS-FRS-r, per la SLA, e la SF-36 ed InQol, per le distrofie. In circa il 40% dei pazienti con MN erano presenti dispnea e compromissione del meccanismo della tosse. Nei pazienti con SLA era

evidente una riduzione significativa del punteggio ottenuto alla scala di disabilità ($p<0.05$). In tutti i pazienti la maggiore disabilità clinica risultava essere significativamente ed inversamente correlata con capacità vitale, volume espiratorio forzato e MIP e MEP ($p<0.01$). Inoltre, nel corso del follow-up, metà dei pazienti SLA e 1/3 dei distrofici hanno intrapreso ventilazione assistita con Bi-PAP. Tutti i pazienti reclutati hanno presentato alterazioni della meccanica respiratoria, pertanto un programma di screening respiratorio risulta essere indispensabile per la corretta gestione dei pazienti con MN.

Modulazione di piccole mutazioni negli esoni “in-frame” del gene distrofina: studi in vitro per identificare il PS-AON ottimale

Spitali P*, Fabris M*, Falzarano S*, Sabatelli P[^], Bovolenta M*, Neri M*, Martoni E*, Tuffery-Giraud S[°], Claustres M[°], Cuisset JM[§], Gualandi F*, Rimessi P*, Ferlini A*

*Genetica Medica, University of Ferrara; [^]IGM-CNR, IOR, Bologna; [°]Laboratoire de Genetique Moleculaire - Institut Universitaire de Recherche Clinique et CHU de Montpellier; [§]CHRU Lille, F-59000 France

L'omissione esonica mediante oligonucleotidi antisenso costituisce uno strumento promettente per ristabilire la cornice di lettura del trascritto distrofina in seguito a delezioni out-of-frame che causano un fenotipo DMD. Fino ad ora lo sforzo in questo senso si è concentrato sulle mutazioni più frequenti di tipo deletivo; il nostro lavoro si focalizza sulla modulazione di piccole mutazioni o mutazioni puntiformi esoniche che rappresentano il 20-30% del totale delle mutazioni a carico del gene distrofina. Abbiamo scelto 5 pazienti DMD su 50 caratterizzati, portatori di piccole mutazioni in esoni in-frame (c.1132_1135dup esone 10, c.1912delC esone 16, c.3447_3448delinsTT esone 26, c.4565delT esone 33, c.4780delTins37 esone 34) e ne abbiamo modulato il riconoscimento da parte del macchinario di splicing prima in un sistema cell-free per poi validare il risultato nei fibroblasti dei pazienti indotti a trasformazione miogenica mediante MyoD. Per ogni esone abbiamo disegnato 2 PS-AONs di cui uno mutazione specifico ed un secondo in una regione dell'esone non coinvolta dalla mutazione. La modulazione dello splicing ad opera dei PS-AONs avviene in entrambi i contesti sperimentali evidenziando una ripre-sa della sintesi della proteina distrofina nelle cellule trattate. L'efficienza dei trattamenti è stata valutata sul trascritto con qRT-PCR e analisi densitometrica nel caso del saggio di splicing cell-free. Concludendo abbiamo sviluppato un saggio di splicing cell-free, indipendente dalla disponibilità di materiale biologico del paziente, in grado di riconoscere in modo efficiente gli esoni del gene distrofina. Questi dati evidenziano la difficoltà nell'identificazione dell'AON più efficace in pazienti portatori di mutazioni private con possibili implicazioni nel disegno di molecole terapeutiche.

Miosite in corso di LES e terapie anti-cellule B: descrizione di un caso

Tavoni A, Del Corso I, Catarsi E, Giori L, Pucci C, Migliorini P

Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa, Italia

La miosite è un evento raro, che si verifica in circa il 3% dei pazienti con lupus sistemico (LES). In una paziente affetta da LES, abbiamo osservato un incremento progressivo della creatinfosfochinasi (CPK), in assenza di altri segni sierologici o clinici di riattivazione di malattia. Un'elettromiografia era compatibile con miosite attiva e la biopsia muscolare mostrava infiltrati linfomonocitari nel tessuto. La paziente, già in terapia con ciclosporina e idrossiclorochina, è stata trattata con alte dosi di steroidi, ottenendo una riduzione solo temporanea della CPK. Anche il trattamento con ciclofosfamide e micofenolato è risultato inefficace. I livelli sierici degli enzimi muscolari sono rimasti persistentemente elevati per oltre un anno. Quando si è manifestata artrite e vasculite cutanea, accompagnata a riduzione della complementemia, aumento di protei-nuria e creatininemia, la paziente è stata trattata con Rituximab 1gr in 2 somministrazioni. Il trattamento ha indotto la scomparsa di artrite e vasculite, la norma-lizzazione dei livelli di complemento e la riduzione lenta dei livelli di CPK. Rituximab è stato impiegato in modo anedddotico nel trattamento delle miositi, ma non ci sono ancora dati sulle miositi in corso di SLE. In questa paziente, la miosite ha un decorso indolente, dissociato da vasculite, nefrite, artrite che sono mediate da immunocomplessi. L'efficacia del Rituximab su tutte le manifestazioni di malattia suggerisce l'utilità di questo farmaco nelle malattie autoimmuni anche non anticorpo-mediate.

Ruolo della scintigrafia oro-faringeo-esofagea nello studio della disfagia nei pazienti con Distrofia Miotonica (DM1)

Valenza V*, Castaldi P*, Modoni A [^], Ricci E [^], Silvestri G [^]

*Istituto Medicina Nucleare[°], [^]Dip. Di Neuroscienze-Università Cattolica S.Cuore, Roma, Italia

La disfagia, spesso associata ad aspirazione tracheo-bronchiale, è un reperto comune nei pazienti DM1. Scopo del lavoro è valutare il ruolo della scintigrafia oro-faringeo-esofagea nello studio della deglutizione nei pazienti DM1. Sono stati sottoposti ad esame scintigrafico 14 pazienti (5M; 9F, età media: 54 aa) confrontati con 17 volontari sani. E' stata effettuata una valutazione qualitativa (analisi delle immagini scintigrafiche) e quantitativa [analisi di: curve attività-tempo, tempi di transito orale, faringeo ed esofageo (OTT, PTT, ETT), indici di ritenzione (ORI, PRI, ERI)]. L'esame ha mostrato significative alterazioni nei pazienti, non presenti nei soggetti normali ($p<0.05$). La valutazione qualitativa ha mostrato: deglutizioni multiple in 5 (36%), deficit di spinta linguale in 10

(71%), di peristalsi faringea in 8 (57%), aspirazione in 3 (21%), flogosi faringea in 9 (64%) e flogosi esofagea in 10 pz (71%). La valutazione quantitativa ha mostrato valori alterati di OTT in 9 pz (64%), di ORI in 11 (78%), di PTT in 10 (71%), PRI in 10 (71%), ETT in 5 (36%) ed ERI in 8 (57%). La scintigrafia oro-faringeo-esofagea è una metodica non invasiva che permette di valutare la disfagia ed il correlato rischio di polmonite ab ingestis nei pazienti DM1, con importanti risvolti terapeutici.

Disfagia e miopatie: studio con scintigrafia oro-faringeo-esofagea

Valenza V*, Villani MF*, Castaldi P*, Masciullo M^, Mirabella M^, Servidei S^, Silvestri G^

*Istituto Medicina Nucleare, Dip. Di Neuroscienze;

^Università Cattolica S.Cuore – Roma, Italia

La disfagia è sintomo comune in alcune miopatie, quali miosite a corpi inclusi (IBM), miopatia oculofaringea (OPMD), miopatie mitocondriali (MM). Scopo del lavoro è valutare il ruolo diagnostico della scintigrafia oro-faringeo-esofagea nello studio della deglutizione in tali patologie. Abbiamo studiato 20 pazienti (7 IBM, 7 OPMD e 6 MM), confrontandoli con un gruppo-controllo, effettuando una valutazione qualitativa e quantitativa [analisi di curve attività-tempo; tempi di transito orale, faringeo ed esofageo (OTT, PTT, ETT) e indici di ritenzione (ORI, PRI, ERI)]. La scintigrafia ha mostrato significative alterazioni nei pazienti, assenti nei controlli ($p < 0.05$). La valutazione qualitativa: deglutizioni multiple in 5 (25%), deficit di spinta linguale in 10 (50%), di peristalsi faringea in 8 (40%), aspirazione in 3 (15%), flogosi faringea in 10 (50%) ed esofagea in 7 pz (35%). Valutazioni quantitative: valori alterati di OTT in 7 pz (35%), ORI in 17 (85%), PTT in 7 (35%), PRI in 12 (60%), ETT in 4 (20%) ed ERI in 6 (30%). Tali alterazioni sono risultate più evidenti nei pazienti con OPMD e MM e nelle fasi orale e faringea della deglutizione. La scintigrafia oro-faringeo-esofagea risulta una metodica utile per valutare la presenza e il grado di disfagia nelle patologie muscolari.

Disfunzione endoteliale nei pazienti con malattie mitocondriali

Vattemi G *, Marini M *, Mechref Y^, Tonin P *, Grigoli L *, Meneguzzi A°, Di Chio M §, Tedesco V §, Lovato L *, Filosto M *, Scarpelli M*, Chiamulera C§, Minuz P°, Novotny MV^, Tomelleri G*

*Department of Neurological Sciences and Vision, Section of Clinical Neurology, University of Verona, Italy; ^Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana; °Department of Biomedical and Surgical Sciences, Section of Internal Medicine, University of Verona, Italy; §Department of Medicine and Public Health, Section of Pharmacology, University of Verona, Italy

Le malattie mitocondriali sono disordini eterogenei dovuti ad un'alterazione della fosforilazione ossidativa. Al fine di testare l'ipotesi che lo stress ossidativo, aumentato nelle malattie mitocondriali, sia

responsabile di disfunzione e danno endoteliale come conseguenza di una ridotta bioattività dell'ossido nitrico, sono state studiate le biopsie muscolari di 16 pazienti con disfunzione mitocondriale e con diverso fenotipo clinico. Abbiamo valutato la localizzazione e l'espressione proteica della 3-nitrotirosina con successiva identificazione delle proteine nitrato. Inoltre abbiamo studiato l'espressione e l'attività degli enzimi deputati alla sintesi di ossido nitrico (NOS). Positività per 3-nitrotirosina è stata riscontrata in un numero statisticamente significativo maggiore di vasi nei pazienti rispetto ai soggetti di controllo. Abbiamo quindi identificato 11 proteine che sono specificatamente nitrato nei pazienti e che risultano coinvolte nel metabolismo energetico cellulare. Nelle biopsie muscolari dei pazienti abbiamo inoltre osservato un'aumentata espressione proteica della eNOS in assenza di differenze significative per la forma neuronale e per quella inducibile. Infine, l'attività totale della NOS, della forma inducibile e delle forme costitutive (eNOS e cNOS) erano aumentate nei pazienti sebbene queste differenze non siano risultate statisticamente significative. L'insieme dei nostri dati preliminari indicano pertanto che le malattie mitocondriali si potrebbero associare ad una disfunzione endoteliale. In 6 pazienti con disfunzione mitocondriale e diverso fenotipo clinico (2 MELAS, 1 MERFF, 3 CPEO) ed in un numero uguale di soggetti sani, la funzione endoteliale è stata indagata mediante tecniche ultrasonografiche rilevando la dilatazione flusso-dipendente delle arterie brachiale e femorale comune. Il test è stato quindi ripetuto dopo somministrazione di vitamina C ed E per 30 giorni. Lo stress ossidativo è stato valutato misurando l'escrezione urinaria di 8-iso-PGF2 α . Nelle biopsie muscolari degli stessi pazienti e di 6 controlli normali è stata inoltre studiata mediante immunoistochimica e microscopia confocale la presenza di 3-nitrotirosina come dimostrazione della formazione di perossinitrito ed il numero di vasi positivi è stato quantificato. La dilatazione flusso-dipendente delle arterie brachiale e femorale comune è risultata significativamente ridotta nei pazienti rispetto ai soggetti sani, mentre il diametro basale delle arterie, la velocità del flusso ematico e la vasodilatazione endotelio-indipendente (ottenuta dopo somministrazione sottolinguale di 300 μ m di nitroglicerina) erano le stesse. La somministrazione di vitamine antiossidanti ha parzialmente ristabilito nei pazienti la dilatazione flusso-dipendente delle arterie. L'escrezione urinaria di 8-iso-PGF2 α era maggiore nei pazienti. Inoltre nei pazienti la positività per 3-nitrotirosina è stata riscontrata in un numero statisticamente significativo maggiore di vasi e la microscopia confocale ha dimostrato una localizzazione della nitrotirosina con le cellule endoteliali ed in parte, con le cellule muscolari della parete dei vasi. L'insieme dei nostri dati preliminari indicano pertanto che le malattie mitocondriali si potrebbero associare ad una disfunzione endoteliale

conseguente ad un aumento stress ossidativo ed alla relativa formazione di perossinitrito.

Coinvolgimento ultrastrutturale tissutale in un caso clinico di glicogenosi tipo II ad esordio tardivo

Vercelli L, Mongini T, Vittonatto E, Morando E, Gai G, Zotta M, Palmucci L

Centro per le Malattie Neuromuscolari, Dipartimento di Neuroscienze, Torino, Italia

La glicogenosi di tipo 2 è una rara malattia ereditaria dovuta al deficit dell'enzima lisosomiale alfa-glucosidasi acida. Descriviamo l'aspetto ultrastrutturale di alcuni organi in un paziente affetto da glicogenosi tipo 2 deceduto a 66 anni per insufficienza respiratoria e sottoposto a riscontro autoptico. All'età di 50 anni aveva sviluppato un'emorragia subaracnoidea in seguito alla rottura di un'aneurisma dell'arteria comunicante anteriore. L'esordio muscolare risaliva a pochi anni prima dell'osservazione e aveva interessato primariamente la muscolatura assiale, con violente algie al rachide e successiva difficoltà nella deambulazione, associata ad ortopnea. L'esame obiettivo neurologico un mese prima del decesso evidenziava ipotrofia con ipostenia dei muscoli paravertebrali e del cingolo pelvico. Era presente significativa iperCKemia (1600 U/l). Il paziente era stato quindi sottoposto a biopsia muscolare, con evidenza di accumulo di glicogeno e dosaggio dell'enzima maltasi acida inferiore al 10%. Il riscontro autoptico è stato eseguito con analisi istologica e ultrastrutturale dei vari organi per valutare l'estensione della compromissione tissutale. L'analisi del tessuto muscolare in più distretti ha evidenziato ubiquitariamente una disorganizzazione strutturale, con perdita di miofilamenti, alterazioni mitocondriali, marcato aumento del glicogeno sia libero che endolisosomiale. Alcuni vasi sanguigni e in particolare l'aorta, il midollo spinale, il nervo trigemino, la sostanza bianca e la sostanza grigia hanno mostrato accumuli di glicogeno, a differenza del rene, polmone e cuore.

Attivazione neuro-ormonale in pazienti con malattie muscolari

Vergaro G[^], Zyw L[^], Fontana M[^], Prontera C[^], Calsolaro V^{*}, Tramonti C^{*}, Siciliano G^{*}, Passino C[^], Emdin M[^]

[^]Fondazione Monasterio, Pisa; ^{*}Dipartimento di Neuroscienze, Università di Pisa, Italia

Il coinvolgimento cardiaco assume rilevanza clinica in alcune malattie neuromuscolari: quadri quali cardiomiopatia dilatativa o ipertrofica e disturbi del ritmo e della conduzione ne possono rappresentare manifestazioni d'esordio e possono evolvere fino all'insufficienza cardiaca. Allo stato attuale non è noto se, in relazione a ciò, si verifichi in questi casi un'attivazione del sistema neuro-ormonale quale evento coinvolto nella fisiopatologia del coinvolgimento cardiologico. Abbiamo considerato un gruppo preliminare di 16

pazienti (13 maschi e 3 femmine) affetti da diverso tipo di malattie muscolari (5 distrofie di Becker, 3 distrofie di Steinert, 2 distrofie muscolari dei cingoli, 1 distrofia di Duchenne, 1 deficit di emerin, 1 miopatia mitocondriale, 3 miopatie non definite) con evidente insufficienza cardiaca e in trattamento farmacologico ottimale. L'età media era 49 ± 17 ; la frazione di eiezione $34 \pm 8\%$ e la classe funzionale NYHA 2,3 $\pm 0,8$. Per ottenere una completa caratterizzazione neuro-ormonale sono stati dosati nel plasma BNP (brain natriuretic peptide), NT-proBNP (aminoterminal proBNP), PRA (plasma renin activity), aldosterone, epinefrina (E), norepinefrina (NE), cortisolo, fT3, e fT4. I livelli di BNP e NT-proBNP (rispettivamente $121,6 \pm 175,1$ e $911,1 \pm 1313,7$ pg/ml vs il limite inferiore normale di 40 e 157 pg/ml rispettivamente) sono risultati alterati. I livelli di PRA erano $2,79 \pm 2,73$ ng/ml/h; aldosterone $181,2 \pm 112,1$ pg/ml; E $33,5 \pm 41,1$ pg/ml; fT3 $2,46 \pm 0,53$ pg/ml; fT4 $12,8 \pm 3,3$ pg/ml. NE è risultato lievemente aumentato ($584,4 \pm 436,7$ pg/ml) paragonato al più alto valore di riferimento (500 pg/ml). L'attivazione neuro-ormonale in pazienti affetti da malattie muscolari con coinvolgimento cardiaco sembra simile a quella usualmente osservata nei pazienti con insufficienza cardiaca di altra origine. Risultavano elevati sia il peptide natriuretico cerebrale che NE, come conseguenza del danno miocardico e dell'attivazione adrenergica. Questa osservazione indica che, stante la specifica eziologia del coinvolgimento cardiaco in tali circostanze, la risposta fisiopatologica neuro-ormonale appare conservata e pertanto utilizzabile come metodo di follow-up laboratoristico cardiologico.

Ridotto stress ossidativo nei pazienti con Distrofia Miotonica tipo 1 dopo somministrazione di integratore di cisteina e superossidodismutasi tipo 1: uno studio in doppio cieco

Volpi L^{*}, Falorni M^{*}, Tramonti C^{*1}, Lo Gerfo A^{*}, Rocchi A^{*}, Franzini M[^], Paolicchi A[^], Lutzemberger L[°], Ravelli V[°], Siciliano G^{*}

^{*}Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurologica; [^]Dipartimento di Patologia Sperimentale; [°]Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurochirurgia, Università di Pisa

La Distrofia Miotonica tipo I (DM1) è una malattia autosomica dominante caratterizzata da coinvolgimento multisistemico. Sebbene la patogenesi non sia ancora completamente chiara, il ruolo dello stress ossidativo nella malattia è suggerito da precedenti studi. Nel presente lavoro è stata valutata la presenza di stress ossidativo in pazienti con DM1 prima e dopo trattamento con integratore a base di cisteina e superossido-dismutasi tipo I (SOD 1). A tale scopo 20 pazienti con DM-1 sono stati sottoposti ad un protocollo di esercizio intermittente incrementale all'avambraccio con dosaggio ematico di markers di stress ossidativo e di sistemi di difesa antiossidante (AOPP, FRAP, GSH) a riposo, durante esercizio e dopo recupero di 15 minuti. A 10 pazienti è stato somministrato un

integratore alimentare a base di cisteina e SOD 1 (10 mg/die) per 30 giorni, mentre gli altri 10 pazienti hanno assunto placebo. I dosaggi ematici e il test da sforzo sono stati ripetuti dopo la terapia. I risultati hanno indicato un'umentata ossidazione proteica nei DM1 sensibilmente ridotta dopo terapia ad indicare un possibile effetto benefico del trattamento antiossidante.

I tests di fatica muscolare

Volpi L, Ricci G.

Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurologica, Università di Pisa, Italia

La fatica muscolare può essere definita come “un complesso fenomeno multifattoriale, caratterizzato dall'impossibilità di assicurare ulteriormente un livello di forza atteso durante una contrazione sostenuta o ripetuta nel tempo”. La fatica è un sintomo comune di molte patologie del sistema nervoso centrale (Malattia di Parkinson, sclerosi multipla, post-ictus), della giunzione neuromuscolare e del sistema nervoso periferico (fatica periferica). Nell'ambito del percorso diagnostico del paziente neuromuscolare, alcuni tests da sforzo possono essere di ausilio per il clinico. Uno di questi è il miometro computerizzato, che permette di misurare in maniera oggettiva la forza muscolare degli arti superiori e inferiori, sia come contrazione volontaria massimale, sia con l'utilizzo di protocolli di esercizio di tipo “endurance” o di tipo incrementale. Nel sospetto di una malattia metabolica, è possibile effettuare un test da sforzo ischemico all'avambraccio per la valutazione di acido lattico e ammonio, mentre per supporto alla diagnosi di malattia mitocondriale può essere utilizzato un test da sforzo incrementale su cicloergometro, con cui evidenziare l'iperlattacidemia. Negli ultimi anni si è fatta strada anche un'altra metodica di studio funzionale del muscolo scheletrico: la risonanza spettroscopica al fosforo-31, con cui sono stati identificati i patterns metabolici basali e durante esercizio di molte patologie neuromuscolari.

Ruolo dei marcatori immuno-infiammatori nella patogenesi delle miositi autoimmuni

Zampieri S[^], Adami N[^], Carraro U[°], Vindigni V[§], Bassetto F[§], Mazzoleni F[§], Doria A^{*}

** Division of Rheumatology, Department of Clinical and Experimental Medicine; ^ Laboratory of Translational Myology, Interdepartmental Research Institute of Myology of the University of Padua; ° Italian C.N.R. Institute of Neuroscience, c/o Department of Biomedical Science, Padua; § Clinic of Plastic and Reconstructive Surgery, University of Padua, Italy.*

La patogenesi delle miositi autoimmuni è ancora discussa anche riguardo il peso relativo di fattori genetici ed ambientali. Tra questi sono alcuni agenti virali, noti per il tropismo muscolare. L'infezione negli individui geneticamente predisposti potrebbe instaurare una risposta infiammatoria prolungata portando ad un'inflammatione cronica e ad un danno tissutale localizzato. L'origine autoimmune del processo patologico è suggerita dalla presenza di autoanticorpi

circolanti considerati marcatori specifici di malattia, e dati in nostro possesso indicano che gli autoantigeni bersaglio della risposta autoimmune in questi pazienti, sono sovraespressi dalle fibre muscolari rigeneranti, in associazione alla risposta infiammatoria che caratterizza i muscoli affetti. Questi dati suggeriscono che la sovraespressione di autoantigeni specifici di miosite durante la miogenesi rigenerativa potrebbe indurre e/o amplificare la risposta immuno-infiammatoria che caratterizza questi pazienti. Il nostro scopo è quello di identificare marcatori specifici coinvolti nella patogenesi delle miositi autoimmuni mediante analisi immunoistochimiche di biopsie muscolari da pazienti affetti da queste malattie, per meglio chiarire l'intero processo che regola il danno muscolare, la rigenerazione e di conseguenza l'evoluzione clinica della malattia.

Central core disease ad esordio adulto: studio clinico, biotico e molecolare di 4 casi

Zicari E^{*}, Malandrini A^{*}, Gambelli S^{*}, Carluccio A^{*}, Gaudiano C^{*}, Mondelli M[^], Salvadori C^{*}, Berti G^{*}, Galli L[°], Orrico A[°], Dotti MT^{*}, Federico A^{*}

**Dipartimento di Scienze Neurologiche e del Comportamento - Università di Siena, ^Laboratorio di Elettromiografia - USL 7 Siena, °Dipartimento Medicina Molecolare - Università di Siena, Italia*

La Central Core Disease è una malattia rara che si manifesta soprattutto nel bambino con quadri clinici di gravità variabile. Rarissimi sono i casi diagnosticati in età adulta. Riportiamo lo studio clinico e molecolare di 4 casi adulti tra di loro non correlati. Caso 1 Uomo 41anni giunto all'osservazione dopo un episodio di rhabdmiolisi insorto in seguito ad intenso esercizio fisico (CK fino a 122.000). EMG: lievi segni miopatici diffusi. Es. Neurol nella norma. Es Molecolare: non mutazioni del gene RYR1. Caso2. Donna di 72 anni giunta per ipostenia agli arti inferiori e difficoltà nella deambulazione da circa 3 anni. CK moderatamente aumentato (380) U/I. EMG: nella norma. Es Neurol: andatura lievemente anserina, ipostenia cingolo pelvico. Esame molecolare: mutazione missense del gene RYR1. Caso 3. Uomo di 70 anni; da circa 10 anni dolori crampiformi agli arti inferiori con progressiva difficoltà nel salire e scendere le scale. Valori di CK elevati (1886 UI/I); EMG: diffusi segni di sofferenza miopatica. Es Neurol: modesta ipostenia cingolo pelvico, andatura lievemente anserina, ipertrofia gastrocnemio sn e ipotrofia gamba dx. Analisi molecolare in corso. Caso 4. Uomo di 49 anni giunto in clinica per mialgie diffuse agli arti inferiori. Valori di CK aumentati (281 UI/I). Es Neurol: ipostenia cingolo pelvico con ipertrofia muscolare diffusa, andatura paraparetica. Analisi molecolare in corso. In tutti e 4 i casi la biopsia muscolare era compatibile con central core disease. Si conferma la multiformalità di presentazione clinica nei casi adulti. Non sempre la malattia è associata a mutazioni del gene RYR1. Possibile eterogeneità genetica.