

NUOVE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE DELLE MALATTIE METABOLICHE

INTRODUZIONE

Le malattie da accumulo lisosomiale (LSDs) sono un gruppo eterogeneo di patologie genetiche dovute al deficit singolo o combinato di proteine lisosomiali, che provoca accumulo intralisosomiale di substrati provenienti da diverse vie metaboliche. I pazienti affetti, generalmente asintomatici alla nascita, possono successivamente presentare manifestazioni cliniche che vanno da un grave coinvolgimento del sistema nervoso centrale ad alterazioni scheletriche che limitano l'autonomia, fino a importanti alterazioni d'organo con conseguenti frequenti ospedalizzazioni e con morte spesso nella prima adolescenza e grande impatto sociale e familiare.

Scopo di questa tesi è porre l'accento sulle nuove strategie terapeutiche che possono non solo salvare la vita dei soggetti affetti da LSDs ma anche migliorarne notevolmente la qualità specie se la diagnosi viene posta precocemente.

GENERALITA' SULLE LSDs

Le LSDs sono un gruppo eterogeneo di patologie genetiche, croniche, multisistemiche a carattere progressivo, dovute all'alterazione dei processi catabolici intracellulari, che prevedono la degradazione delle macromolecole all'interno dei lisosomi, ciò porta ad accumulo di tali macromolecole all'interno dei lisosomi stessi.

Le LSDs hanno distribuzione panetnica (ad eccezione della Gaucher e della Tay-Sachs molto diffuse tra gli ebrei Ashkenazy), ed un'incidenza globale di circa 1:5000 nati vivi. La trasmissione di tali patologie è di tipo autosomico recessivo fatta eccezione per la MPS II e per la malattia di Fabry che hanno un meccanismo ereditario di tipo X-linked.

Abbiamo già detto che la maggior parte delle LSD si manifestano nei primi anni di vita o comunque in età pediatrica; in questi ultimi anni però è sempre più frequente la diagnosi in pazienti con forme varianti ad esordio in età adulto-avanzata, ed è proprio per l'esistenza di varianti lievi che sono molto importanti l'anamnesi familiare e segni clinici chiave per poter porre diagnosi il più precocemente possibile.

Consanguineità tra i genitori o appartenenza a gruppi etnici con elevata endogamia, fratelli affetti da LSDs, supportano il sospetto clinico. L'età di esordio può essere specifica di uno o pochi difetti come ad esempio nella Gaucher grave infantile che si manifesta con idrope fetale, ittiosi, organomegalia e artrogriposi; o come nel caso della m. di Niemann-Pick in cui si riscontra un prolungato ittero colestatico neonatale.

Clinicamente le LSDs si possono presentare con manifestazioni neurologiche, sistemiche, d'organo, si tenga però in considerazione che tra queste patologie ci sono forme ad esclusivo interessamento neurologico come la Leucodistrofia di Krabbe e la Leucodistrofia Metacromatica, e forme ad esclusivo interessamento viscerale ad esempio la m. di Gaucher tipo I e la Niemann-Pick tipo B.

I segni neurologici presenti sono: l'arresto o la regressione psicomotoria aventi decorso progressivo, convulsioni, neuroimmagini indicative (leucodistrofia), alterazioni oculari (macchia rosso ciliegia, opacità corneale), neuropatia. Se l'esordio è nei primi mesi di vita, non essendo ancora raggiunte tappe importanti dello sviluppo, è difficile rilevare arresto-regressione psicomotoria per cui spesso viene erroneamente diagnosticata una sofferenza perinatale.

Dismorfismi faciali possono essere presenti nelle LSDs ed esordire precocemente come nella MPS IH e nella Mucopolipidosi II, o essere inizialmente sfumati per poi diventare progressivamente significativi come nella MPS III.

Epatite e/o splenomegalia possono essere molto evidenti o di lieve entità. Le manifestazioni osteo-articolari sono presenti in numerose LSDs e consistono per lo più nella presenza di rigidità articolare, gibbo dorso-lombare ed altre alterazioni scheletriche che nell'insieme prendono il nome di disostosi multipla. La cardiomiopatia è un altro segno clinico tipico di LSDs, il cui esordio nei primi mesi è associato ad ipotonia ed è suggestivo per la diagnosi di m. di Pompe infantile, se invece si associa a disostosi, splenomegalia e dimorfismi ci può indirizzare verso una diagnosi di gangliosidosi GM1 tipo I variante o verso una MPS; è stata di recente descritta una variante cardiaca della m. di Fabry caratterizzata da cardiomiopatia in età adulta, con assenza o con impercettibile presenza di alcuni sintomi cardinali della malattia (angiocheratomi, opacità corneali, acroparestesie, proteinuria).

Le alterazioni cutanee consistono in ittiosi, teleangectasie cutanee, ipertricosi con sopracciglia folte, lesioni vasculo-cutanee rosso violacee (come nella malattia di Fabry).

Da quanto suddetto si capisce che la diagnosi di LSDs non sempre è facile ed evidente, per cui a volte è il semplice sospetto clinico che rappresenta il punto di partenza per la ricerca di segni clinici più o meno evidenti che portano poi alla corretta diagnosi tramite le indagini strumentali, biochimiche e molecolari.

La diagnosi definitiva di queste malattie viene eseguita tramite il dosaggio qualitativo e quantitativo delle sostanze di accumulo escrete con le urine, si procede successivamente alla dimostrazione della carenza enzimatica tramite il dosaggio degli enzimi lisosomiali su siero, leucociti, e fibroblasti in coltura ottenuti tramite biopsia cutanea. Oggi è anche possibile fare l'analisi molecolare delle mutazioni responsabili della carenza enzimatica, cosa che è particolarmente utile per la diagnosi di eterozigosi o per la diagnosi prenatale (per quest'ultima è anche possibile effettuare il dosaggio enzimatico nei villi coriali e negli amniociti).

È chiaro che una diagnosi precoce di queste patologie potrebbe consentire un intervento terapeutico precoce sui soggetti affetti ed uno stretto monitoraggio sui soggetti a rischio. L'individuazione precoce di tali patologie poggia essenzialmente su: a) studio familiare nei casi di un probando diagnosticato; b) screening mirato su soggetti con manifestazioni cliniche suggestive di LSDs; c) screening neonatale.

a) **Studio familiare.** Nelle famiglie con soggetti affetti da LSDs un'anamnesi accurata, il rilievo di segni obiettivi specifici di certe patologie appartenenti al gruppo di LSDs, gli studi biochimici e molecolari possono consentire una completa chiarificazione della situazione familiare con possibilità di una adeguata consulenza genetica e di una diagnosi prenatale ove richiesta e possibile. Da non sottovalutare inoltre la possibilità di trattare pazienti presintomatici (trapianto di midollo, terapia enzimatica sostitutiva), senza dimenticare gli inibitori della sintesi dei substrati e le molecole chaperoniche.

b) **Screening mirato.** Sappiamo che la diagnosi di LSDs è molto complessa e richiede dosaggi multipli su urine sangue e colture cellulari con tempi di risposta molto lunghi; per tale motivo, in soggetti che presentano segni clinici suggestivi di patologia lisosomiale, si può molto precocemente eseguire uno screening mirato con le metodiche messe a punto da Chamoles per le 5-6 patologie per cui è già disponibile la terapia. Tali metodiche consistono in dosaggi di alcuni enzimi lisosomiali su spot di sangue con rivelazione fluorimetrica per ogni singolo enzima. Tale metodica ha il vantaggio di permettere l'invio a distanza di campioni di sangue raccolti su carta da filtro analogamente a quanto effettuato per i normali screening neonatali. Questo tipo di approccio però non permette l'identificazione di soggetti in fase presintomatica, ma se, il sospetto è molto precoce, può rendere possibile semplificando l'iter diagnostico, un intervento terapeutico altrettanto precoce.

c) **Screening neonatale.** Eccetto per i rari casi familiari, l'identificazione presintomatica di LSDs può essere ottenuta soltanto con lo screening esteso a tutta la popolazione neonatale. Marcatori precoci recentemente identificati quali proteine associate alla membrana lisosomiale LAMP-1,

LAMP-2 e Saposina C (Sap-C), sono stati utilizzati per l'identificazione presintomatica di malattia da accumulo in quanto presenti ed alterati già nei primi giorni di vita. Circa l'80% dei soggetti affetti potrebbe essere identificato alla nascita con la determinazione delle stesse. Uno screening neonatale pilota su svariate decine di migliaia di soggetti è stato condotto in Australia con risultati incoraggianti. L'analisi viene condotta mediante la valutazione quantitativa simultanea di due diversi anticorpi sulla membrana lisosomiale, anti-LAMP-1 e anti-LAMP-2 e la presenza di anticorpi anti-Sap-C nel plasma dei soggetti esaminati. La tecnica prevede un primo screening della popolazione neonatale da effettuarsi sugli spot dei cartoncini Guthrie; i soggetti positivi sono ulteriormente valutati mediante altre metodiche per confermare il sospetto. Il principale limite di questa metodica consiste nel fatto che essa riesce a "scrinare" anche le LSDs non ancora curabili, cosa che dal punto di vista etico pone diversi problemi. Tali problematiche e i risultati non completamente soddisfacenti dello screening mediante LAMP-1, LAMP-2 e Sap-C hanno indirizzato verso la ricerca di altre strategie di screening e cioè: 1) screening enzimatico multiplo con la tecnica di Chamoles, secondo cui è possibile sottoporre a screening solo le patologie per le quali è attualmente disponibile la terapia. 2) screening enzimatico con rivelazione multipla in tandem massa, solo per LSDs trattabili. 3) screening multiplo in tandem massa con ricerca diretta dei metaboliti accumulati. Questa tecnica permette di ricercare solo i difetti per cui è disponibile la terapia ed è meno indaginosa delle metodiche precedenti in quanto si basa sulla identificazione dei metaboliti patologici dopo una semplice estrazione e derivatizzazione.

Classificazione delle LSDs

Le malattie lisosomiali vengono classificate in base alle caratteristiche biochimiche dei substrati accumulati e dei meccanismi mediante i quali tali substrati vengono accumulati nei lisosomi.

Si distinguono in:

- Malattie da difetto di degradazione dei mucopolisaccaridi o Mucopolisaccaridosi
- Malattie da difetto di degradazione degli sfingolipidi o Sfingolipidosi
- Malattie da difetto di degradazione delle glicoproteine o Glicoproteinosi
- Malattie da accumulo di glicogeno (Glicogenosi tipo II)
- Malattie dovute ad alterato trasporto degli enzimi lisosomiali nei lisosomi
- Malattie dovute ad alterato trasporto dei substrati nei lisosomi
- Malattie da difetto di degradazione di altri substrati.

Mucopolisaccaridosi

Le mucopolisaccaridosi (MPS) sono il gruppo di malattie lisosomiali causate dalla carenza di enzimi che catalizzano la degradazione dei glicosaminoglicani (dermatan-solfato, eparan-solfato, cheratan-solfato, condroitin-solfato e acido ialuronico), detti anche mucopolisaccaridi, sostanze costituenti la matrice del connettivo e quindi presenti praticamente in tutti i tessuti corporei. Questa alterazione della via catabolica comporta accumulo di glicosaminoglicani (GAG) all'interno delle cellule dei vari tessuti provocando disfunzione d'organo ed un'elevata escrezione urinaria degli stessi mucopolisaccaridi. I deficit enzimatici possono essere singoli o combinati. Attualmente conosciamo 11 differenti carenze enzimatiche che danno 7 forme di MPS.

Queste malattie, come del resto le altre LSDs, sono trasmesse con modalità autosomica recessiva, ad eccezione dell'MPS II che ha una trasmissione di tipo X-linked. Grazie ai progressi della genetica oggi conosciamo le origini molecolari di ogni singola MPS.

Clinicamente sono caratterizzate da diverse manifestazioni con differente espressività a secondo dell'enzima coinvolto. Questi quadri clinici includono decorso cronico e progressivo, coinvolgimento multisistemico, visceromegalia, disostosi multipla (viene così definito il quadro radiologico delle manifestazioni scheletriche), facies grossolana, coinvolgimento dell'apparato visivo, uditivo, cardiovascolare, respiratorio, articolare. In alcune MPS è presente ritardo mentale che può essere più o meno grave.

Come dicevamo col termine disostosi multipla si intende il quadro radiologico delle deformità ossee, le più comuni sono: malformazioni a carico dei corpi vertebrali (con comparsa di gibbo specie dorso-lombare), restringimento del bacino, appiattimento delle ali iliache, coxa valga, slargamento delle diafisi delle ossa lunghe, slargamento dell'estremità prossimale delle ossa metacarpali. Altro reperto caratteristico è l'ipoplasia dell'osso odontoide con conseguente instabilità della giunzione cranio-vertebrale; frequente e precoce è la displasia dell'anca. In alcuni pazienti è possibile un riscontro radiografico tipo morbo di Perthes.

Può essere spesso presente idrocefalo ad andamento lentamente progressivo, che pare sia dovuto alla combinazione tra atrofia corticale secondaria a degenerazione del S.N.C. e a deficit di riassorbimento del liquor (per ispessimento delle meningi e disfunzione della granulazione del Pacchioni nei villi aracnoidei). La progressiva ipertensione endocranica che colpisce questi pazienti richiede spesso interventi di decompressione.

A livello oculare l'opacità corneale è la manifestazione più frequente nelle MPS (I, IV, VI, VII) e può portare ad un importante deficit visivo. Il glaucoma è la complicanza oculare più grave delle MPS ed è causato dall'ispessimento di cornea e sclera che fa aumentare la pressione della camera anteriore dell'occhio. Nelle MPS I, II e III si può avere degenerazione retinica con decremento della visione periferica e cecità notturna.

A livello uditivo i pazienti con MPS hanno una sordità sia di tipo neurosensoriale sia di tipo trasmissivo. La sordità sembra dovuta sia alle frequenti infezioni a carico dell'orecchio medio, sia a deformità a carico di incudine, martello e staffa e probabilmente anche ad anomalie dell'orecchio interno.

Un segno tipico delle MPS è la rigidità articolare (ad eccezione della malattia di Morquio dove invece abbiamo lassità articolare), che causa una progressiva perdita della funzionalità delle articolazioni. Ciò è anche dovuto alla deformità delle ossa che costituiscono il metacarpo e al deposito di GAG nelle capsule articolari. Inoltre la progressività della rigidità articolare, oltre a portare al tipico segno della mano ad artiglio, comporta nella maggior parte dei casi la sindrome del tunnel carpale. In questo caso per garantire a questi pazienti una migliore qualità di vita, si rendono necessarie sia la fisiochinesiterapia sia l'intervento chirurgico.

Restringimento della trachea, ispessimento delle corde vocali, macroglossia e sovrabbondanza dei tessuti nelle alte vie respiratorie contribuiscono all'ostruzione a carico delle vie aeree. Queste ostruzioni possono portare ad apnee del sonno con conseguente ipoventilazione, e/o ipersonnia.

Dal punto di vista cardiovascolare questi pazienti presentano patologie valvolari (rigurgito della mitrale più frequentemente), ispessimento del miocardio, ipertensione sistemica e polmonare, restringimento delle coronarie con conseguente ischemia, restringimento dell'aorta addominale e delle arterie renali a cui consegue ipertensione. Per questo motivo è necessario eseguire un costante follow-up cardiologico.

Abbiamo anche detto che gli affetti da MPS presentano visceromegalia, specie epatosplenomegalia, senza che però sia alterata la funzione di tali organi.

La compressione del midollo spinale è comunemente presente nella MPS IV, ma è possibile riscontrarla anche nelle altre forme. Questa compressione deriva dalla sublussazione dell'articolazione atlanto-occipitale, e quando i sintomi sono ormai evidenti e costanti è

necessario eseguire un intervento di stabilizzazione a carico di questa struttura. Altra causa di mielopatia da compressione è la cifosi lombare.

La diagnosi di MPS viene fatta sulla base del quadro clinico, sul dosaggio dei mucopolisaccaridi urinari escreti (test rapido), che risulta essere anche 10 volte superiore a quello di un soggetto normale; ma la diagnosi di certezza si basa sul dosaggio dell'enzima sostitutivo nei leucociti o nei fibroblasti in coltura. Oggi è anche possibile eseguire la diagnosi prenatale su cellule coltivate provenienti da prelievo di liquido amniotico o di villi coriali. L'importanza dell'indagine prenatale è intuibile soprattutto per quelle famiglie dove è già presente un probando. Inoltre è anche possibile fare diagnosi di portatore in quelle famiglie dove è presente una mutazione conosciuta, è però necessario identificare l'allele mutato prima di sottoporre i componenti di un nucleo familiare all'indagine molecolare.

Le MPS sono state considerate incurabili per molto tempo. Il successo del trapianto di midollo osseo nell'alterare il decorso della patologia, ha dimostrato che l'enzima proveniente da cellule di donatori può ridurre l'accumulo di glicosaminoglicani (GAG) nelle cellule dei soggetti affetti. Questa considerazione ha aperto la strada per nuove strategie terapeutiche e cioè la terapia enzimatica sostitutiva (ERT), oggi possibile per alcune MPS, e in futuro la terapia genica.

Di seguito viene proposta una carrellata di ciascuna forma di MPS.

MPS I

Questa forma è dovuta alla carenza di α -L-iduronidasi che comporta accumulo di dermatansolfato ed eparan-solfato, il gene codificante per l'enzima si trova sul cromosoma 4 (4p16.3), le mutazioni più frequenti sono la W402X e la 970X. Clinicamente si distinguono 3 forme: Hurler, Scheie, Hurler-Scheie dovute a diverse mutazioni alleliche a carico dello stesso gene.

MPS IH (Hurler). È una malattia progressiva con coinvolgimento multiplo di organi e tessuti dove sono presenti cellule vacuolate o "gargoyle", che contengono lisosomi ripieni di mucopolisaccaridi, inoltre nell'encefalo abbiamo anche l'accumulo di lipidi. In generale questo accumulo comporta la ialinizzazione del collagene con separazione delle sue fibre, il che determina deformità articolari con rigidità, ispessimento meningeo, idrocefalo, tendenza a sviluppare ernie, con il progredire della patologia si verificano inoltre ispessimento delle valvole cardiache, restringimento delle coronarie, irrigidimento miocardio, ritardo mentale progressivo. La potremmo definire come il prototipo delle MPS. I soggetti affetti alla nascita presentano un aspetto normale o presentare solo ernia inguinale o ombelicale. Nel corso del primo anno di vita possono avere solo un lieve ritardo dello sviluppo. I primi segni della malattia si evidenziano tra i 4 e i 18 mesi di età. Questi bambini presentano macroglossia, respiro rumoroso, scolo nasale, infezioni respiratorie ricorrenti, epatosplenomegalia, opacità corneale, ernia ombelicale e/o inguinale, ritardo di crescita staturale-ponderale (la massima altezza raggiunta è 110 cm), denti piccoli, tozzi e distanziati tra di loro, capelli ispidi e secchi, radice del naso a sella, narici ampie e anteverse, labbra tumide e spesse, cute spessa, irsutismo, rigidità articolare (specie di gomiti e ginocchia), ritardo psicomotorio, idrocefalo e incremento della pressione intracranica. La disostosi multipla, che fa parte di questo quadro clinico, consiste nella presenza di macrocrania con dolicocefalia, scafocefalia, chiusura precoce della sutura lambdoidea, prominente delle bozze frontali, slargamento a "J" della sella turcica, anormale spaziatura dei denti, ipoplasia delle vertebre lombari con precoce cifosi. Le coste sono appiattite o a forma di remo, a livello pelvico si riscontrano incurvamento pelvico con acetabolo poco profondo, spesso si ha coxa valga. Sono inoltre presenti slargamento delle diafisi delle ossa lunghe, clavicole corte, falangi corte e sottili, allargamento delle estremità distali delle ossa metacarpali (il quinto metacarpo è il primo a evidenziare queste modificazioni). Molto gravi sono le manifestazioni cardiache, infatti spesso questi bambini muoiono entro i 10 anni d'età per scompenso cardiaco dovuto spesso a patologia delle coronarie o per insufficienza respiratoria.

MPS IS (Scheie). Questa forma è la forma più benigna tra le mucopolisaccaridosi e, differentemente dalla forma IH, comporta solo accumulo di dermatan-solfato nei tessuti e sua aumentata escrezione urinaria. Esordisce a 5-6 anni ed è caratterizzata da rigidità articolare con la comparsa della caratteristica mano ad artiglio e la successiva insorgenza della sindrome del tunnel carpale, di rigidità e dolore a carico dei piedi, di pectus excavatum, di collo corto, di mani e piedi corti e tozzi, di ginocchio valgo, di opacità corneale, di degenerazione retinica, di glaucoma, di grossolanità facciali molto lievi con marcato prognatismo. Lo sviluppo intellettuale e la statura sono normali; a livello cardiaco i pazienti presentano stenosi o rigurgito delle valvole causate dall'accumulo di GAG sulle corde tendinee. A livello respiratorio abbiamo ostruzione delle vie aeree con apnee notturne; spesso questi soggetti hanno mielopatia dovuta alla compressione del midollo. Questa forma consente comunque la sopravvivenza fino all'età adulta. La diagnosi della forma IS clinicamente non è facile poiché il quadro è estremamente sfumato, ma è possibile comunque dosare l'enzima carente e i mucopolisaccaridi urinari.

MPS IS/H (Hurler-Scheie). Questa forma è una sorta di ibrido delle precedenti, i soggetti affetti presentano i primi sintomi tra i 3 e gli 8 anni e come nella forma di Scheie la sopravvivenza arriva fino all'età adulta. Sono presenti opacità corneale, rigidità articolare, micrognatia, spondilolistesi e mielopatia, ritardo mentale lieve o assente.

MPSII

Conosciuta anche sindrome di Hunter, è l'unica MPS a trasmissione X-linked. A livello del cromosoma X (Xq27-28) si trova il gene che codifica per l'iduronato-solfatasi, il cui deficit determina accumulo di dermatan-solfato ed eparan-solfato. È stato riscontrato che nelle forme gravi il gene è totalmente o parzialmente deletato. L'incidenza della malattia è di 1/132.000 maschi. Il fenotipo è molto simile alla Hurler ma con espressività meno grave e decorso più lento e progressivo. Le anomalie facciali sono presenti ma in forma lieve, caratteristica è la precoce sordità che presenta peraltro carattere progressivo, sono presenti epatosplenomegalia, ernie inguinali e/o ombelicali, noduli sottocutanei specie a livello interscapolare e sulla superficie estensoria degli arti. Il ritardo psicomotorio è di grado variabile e la disostosi multipla è più sfumata rispetto alla Hurler. È assente l'opacità corneale. In base all'età d'esordio la Hunter è distinta in forma grave e lieve.

La forma grave è la forma classica, esordisce già nel primo anno di vita e presenta le stimate caratteristiche della malattia (facies grossolana, bassa statura, rigidità articolare, epatosplenomegalia, ernie, grave ritardo mentale) a cui si associano diarrea cronica (a causa del coinvolgimento del sistema nervoso autonomo e delle alterazioni a carico della mucosa intestinale), grave degenerazione retinica, idrocefalo. La morte si verifica entro la pubertà per insufficienza cardio-respiratoria, per ostruzione delle vie aeree e per disfunzioni valvolari e miocardiche.

La forma lieve è a decorso estremamente lento, tanto che consente la sopravvivenza anche fino a 50 anni d'età. I sintomi si presentano in forma estremamente lieve e non è compromessa la capacità intellettuale dei soggetti affetti. I pazienti presentano sordità, rigidità articolare con comparsa della sindrome del tunnel carpale e progressiva perdita della funzionalità articolare, mielopatia da compressione del midollo spinale, papilledema per deposizione dei GAG nella sclera con conseguente sofferenza del nervo ottico. Una complicanza è rappresentata dall'ostruzione delle vie aeree per l'accumulo dei mucopolisaccaridi nella trachea e nei bronchi.

MPS III

Nota anche come sindrome di Sanfilippo è distinta in quattro forme diverse (A,B,C,D) sulla base del difetto enzimatico presente. La Sanfilippo A è dovuta alla carenza di eparan-N-sulfatasi; la B a deficit di α -N-acetilglucosaminidasi; la C a carenza di acetil-CoA- α -glucosamide-acetiltransferasi; la Sanfilippo D ad assenza di N-acetilglucosamino-6-sulfatasi.

Nonostante ciò clinicamente i fenotipi si somigliano molto e il substrato accumulato è sempre l'eparan-solfato. L'incidenza della malattia è di 1/24.000.

I bambini affetti presentano ritardo d'acquisizione delle tappe dello sviluppo e sono iperattivi. Si assiste a neurodegenerazione con demenza, gravi disturbi comportamentali (soprattutto aggressività), disturbi del sonno, instabilità motoria, convulsioni resistenti alla terapia. Tali sintomi esordiscono intorno a 4 anni. Lo sviluppo staturale-ponderale è nella norma, sono invece rappresentati dismorfie facciali, irsutismo, epatosplenomegalia ed alterazioni scheletriche.

MPS IV

Conosciuta anche come sindrome di Morquio, è dovuta al deficit di N-acetil-galattosamina-6-solfatasi (Morquio A) e β -galattosidasi (Morquio B), che determinano accumulo di cheratan-solfato e conseguente elevata escrezione urinaria dello stesso. La forma più grave e comune è la A. il cui gene per la galattosio-6-sulfatasi è stato mappato sul cromosoma 16 (16q24), mentre il gene per la β -galattosidasi è situato sul cromosoma 3 (3p21,33). La caratteristica principale di questa MPS è il grave coinvolgimento scheletrico associato a opacità corneale e in assenza di ritardo cognitivo. Già ad un anno si hanno lassità articolare e bassa statura, a 2 anni sono presenti dismorfie facciali con prognatismo e bocca larga, ipoplasia dello smalto dentale, protrusione sternale, deformità toracica, cifosi o scoliosi dorso-lombare, valgismo delle ginocchia, scarso accrescimento staturale (l'altezza definitiva in età adulta non supera i 120 cm), limitazione funzionale sia delle grosse articolazioni sia delle metacarpo-falangee e interfalangee. Sono inoltre presenti: ostruzione delle vie aeree superiori, epatomegalia, lieve opacità corneale, coinvolgimento auricolare, lesioni delle valvole cardiache, denti piccoli con tendenza alla carie. La sopravvivenza può arrivare fino all'età adulta (50 anni) a meno che non subentrino complicanze cardiopolmonari dovute alla deformità della gabbia toracica ed alla mielopatia da compressione.

Da un punto di vista radiologico abbiamo:

- ipoplasia del dente dell'epistrofeo che può causare sublussazione dell'articolazione atlanto-occipitale con conseguente mielopatia da compressione.
- platispondilia delle vertebre del tratto dorso-lombare, con protrusione anteriore dei corpi vertebrali
- alterazioni strutturali gravi delle ossa di carpo e tarso
- coxa valga con displasia progressiva della testa del femore e ipoplasia del tetto acetabolare.

MPS VI

La malattia di Maroteaux-Lamy è dovuta al deficit di N-acetil-esosamina-4-solfato-solfatasi (arilsulfatasi B) con conseguente accumulo intralisosomiale di dermatan-solfato ed elevata escrezione urinaria dello stesso. Il gene è stato mappato sul cromosoma 5 (5q13-14). La diagnosi si basa sul dosaggio enzimatico nei leucociti e nei fibroblasti in coltura e sul riscontro di aumentata escrezione urinaria di dermatan-solfato. Clinicamente si distinguono due forme la A il cui fenotipo è grave, la B in cui le deformità scheletriche sono meno pronunciate, l'eterogeneità delle manifestazioni cliniche è dovuta alle diverse mutazioni che interessano gli esoni codificanti. La MPS VI è caratterizzata da un grave interessamento scheletrico (macrocrania, collo corto e tozzo, torace carenato, mano ad artiglio con rigidità articolare e successiva comparsa di sindrome del tunnel carpale), nanismo disarmonico, protrusione addominale dovuta ad epatomegalia, opacità corneale, sordità tardiva di tipo neurosensoriale, normale sviluppo psicomotorio, spesso abbiamo idrocefalo e ipertensione endocranica, mielopatia da compressione; il quadro radiografico è quello della disostosi multipla già visto nella sindrome di Hurler. La morte subentra nella seconda-terza decade di vita per l'interessamento cardiaco, che comprende insufficienza mitralica e rigurgito aortico.

MPS VII

La malattia di Sly è una forma molto rara, di cui sono stati ad oggi descritti pochissimi casi, dovuta al deficit di β -glucuronidasi e associata ad aumentata escrezione urinaria di dermatan-solfato e condroitin-solfato. Il gene codificante è situato sul cromosoma 7 (7q21.1-q22). Clinicamente abbiamo forme molto gravi con ritardo mentale, dismorfie, disostosi multipla, bassa statura, epatosplenomegalia, ernie. Accanto a questa esistono forme ad espressività clinica più sfumata.

Sfingolipidosi

Le sfingolipidosi sono malattie da accumulo degli sfingolipidi componenti della membrana cellulare (si trovano in ogni cellula del corpo) la cui struttura principale è costituita da sfingosina (prodotta dalla condensazione tra serina e acido palmitico) che si lega ad un acido grasso formando ceramide che a sua volta si lega alla fosfocolina e ad uno o più zuccheri dando così gli sfingolipidi. Essi devono essere degradati dagli enzimi lisosomiali ed un qualsiasi difetto della via catabolica ne provoca l'accumulo all'interno dei lisosomi con caratterizzazione clinica differente a seconda della distribuzione del metabolita stesso nell'organismo.

I segni clinici delle sfingolipidosi compaiono spesso dopo la nascita (per il progressivo accumulo di tali metaboliti), in seguito ad un periodo di apparente normalità. Si possono distinguere forme che interessano prevalentemente il S.N.C. (es. Tay-Sachs), forme che interessano prevalentemente tessuti periferici (es. Gaucher) e forme miste (es. Niemann-Pick).

Le sfingolipidosi vengono distinte in: gangliosidosi, malattia di Gaucher, malattia di Niemann-Pick, leucodistrofia metacromatica, leucodistrofia di Krabbe, malattia di Fabry, malattia di Farber e mucosulfatidosi. Di seguito tratteremo il profilo di ciascuna di esse.

Gangliosidosi GM1

È dovuta a mutazione a carico del gene della β -galattosidasi, situato sul cromosoma 3 (3pq21). Tale enzima è preposto alla degradazione dei gangliosidi, sfingolipidi particolarmente rappresentati nelle membrane neuronali. Clinicamente la GM1 si presenta in 3 differenti forme GM1 tipo I, II e III a seconda dell'età d'esordio.

GM1 tipo I. È la forma classica e si presenta già alla nascita con epatosplenomegalia, facies grossolana con prominenza delle bozze frontali, macroglossia, irtutismo, cute spessa, edema dell'estremità e dello scroto, ernie inguinali e ombelicali, rash cutanei (non spiegabili come usuali eruzioni neonatali), cardiomegalia e segni di ipertrofia ventricolare, ipotonia, grave compromissione neurologica, convulsioni. Nel 50% dei pazienti è presente degenerazione retinica con la caratteristica macchia rosso ciliegia a carico della macula. Inoltre è presente deformazione a carattere ovoidale a carico dei corpi vertebrali, slargamento della sella turca. L'exitus avviene generalmente entro il 1° anno di vita.

GM1 tipo II. Esordisce tra i 6 e i 18 mesi di vita con atassia, strabismo e deterioramento cognitivo, vi possono essere macchia rosso-ciliegia o atrofia del nervo ottico. Molto frequenti le convulsioni che sono di tipo tonico-clonico, la malattia porta ad una graduale progressione verso la tetraparesi spastica e cecità, mentre sono assenti la visceromegalia, la disostosi multipla e la facies con lineamenti grossolani. L'exitus avviene nella 1° decade di vita.

GM1 tipo III. È la forma dell'adulto, particolarmente rara ed è caratterizzata solo da manifestazioni neurologiche del tipo degenerazione spino-cerebellare a cui si associa un tardivo deterioramento mentale.

In tutte e tre le forme di GM1 la diagnosi si basa sul dosaggio enzimatico della β -galattosidasi su leucociti o fibroblasti in coltura, è possibile fare anche la diagnosi prenatale dosando l'enzima negli amniociti o nei villi coriali. Non esiste alcun trattamento specifico per questa patologia se non la terapia sintomatica.

Gangliosidosi GM2

Dovuta ad accumulo di ganglioside GM2 a causa del deficit di β -esosaminidasi enzima esistente in due diverse isoforme: la forma A costituita da una catena α e da una β , e la forma B costituita solo da catene β . Esistono pertanto due diverse varianti di GM2: la malattia di Tay-Sachs e la malattia di Sandhoff.

La GM2 variante B o **malattia di Tay-Sachs** è dovuta al deficit o all'assenza della subunità α dell'esosaminidasi che è mappata sul cromosoma 15. Tale variante è molto frequente tra gli ebrei Ashkenazy, può esordire in età infantile, giovanile o adulta.

La forma infantile si manifesta tra i 3 e i 6 mesi di vita con arresto dello sviluppo psicomotorio, iperacusia, ipotonia, cecità, macrocrania, tetraparesi spastica. Nella quasi totalità dei soggetti è presente macchia rosso ciliegia a livello retinico; nel 2° anno di vita si possono manifestare convulsioni. La morte sopraggiunge tra i 2 e i 4 anni.

La forma giovanile è molto rara si manifesta tra i 2 e i 6 anni con disturbi dell'andatura e difficoltà del linguaggio, a ciò seguono deterioramento mentale e motorio.

La forma dell'adulto esordisce nella seconda decade di vita con sintomi simili a quelli della SLA o della SM, atassia, disartria e disturbi del movimento, raramente esordisce con psicosi.

La malattia di Tay-Sachs deve essere sempre sospettata in soggetti con sintomi neurologici e macchia rosso ciliegia a livello della macula, in assenza però di segni di visceromegalia presenti nelle altre forme di LSDs. In atto non esiste alcuna terapia specifica per questa patologia.

La GM2 variante 0 o **malattia di Sandhoff** è causata dal deficit di entrambe le esosaminidasi A e B e clinicamente, rispetto alla Tay-Sachs, si manifesta anche con epatosplenomegalia e alterazioni scheletriche. Il gene codificante per la catena β dell'esosaminidasi è localizzato sul cromosoma 5 (5q11).

Esiste anche una forma di GM2 dovuta al deficit dell'attivatore GM2, proteina che agisce come attivatore dell'esosaminidasi, pertanto l'enzima nelle sue due isoforme è normalmente rappresentato. Clinicamente questa forma di GM2 è sovrapponibile alla Tay-Sachs o alla Sandhoff.

Malattia di Gaucher

È la forma più frequente di sfingolipidosi dovuta al deficit di β -glucocerebrosidasi che determina accumulo di glicosil-cerebrosidi a carico del sistema reticolo endoteliale in particolare nella milza e nel midollo osseo. L'enzima carente viene codificato da un gene mappato sul cromosoma 1 (1q21-q31). Si conoscono più di 100 mutazioni responsabili della patologia alcune particolarmente frequenti come la N370S responsabile di una forma lieve di Gaucher tipo I; mentre la mutazione L444P è associata con la forma neuropatica della malattia.

Caratteristica di questa patologia è la presenza delle cosiddette cellule di Gaucher dovute all'accumulo di glucosil-ceramidi nelle cellule del sistema reticolo-endocitario, che appaiono voluminose con nucleo piccolo ed eccentrico, citoplasma chiaro. Tali cellule però possono essere presenti anche in altre patologie quali mieloma multiplo, linfomi, malattia di Hodgkin.

La m. di Gaucher esiste in tre differenti forme cliniche:

- a) cronica non neuropatica o tipo I (rappresenta la patologia lisosomiale più frequente)
- b) acuta neuropatica o tipo II
- c) subacuta neuropatica o tipo III

La diagnosi si basa sul dosaggio dell'enzima carente su leucociti o fibroblasti coltivati.

La malattia di Gaucher **tipo I** è caratterizzata da astenia progressivamente ingravescente, pallore, inappetenza, deficit di crescita staturale-ponderale, splenomegalia progressiva,

trombocitopenia, leucopenia. Più tardivamente compare modesta epatomegalia; sono inoltre presenti alterazioni ossee a carico soprattutto delle zone prossimali e distali delle ossa lunghe sotto forma di fenomeni osteolitici e osteopenici, tipica è la deformazione a “bottiglia” del femore, dovuta all’alternarsi di sclerosi e atrofia; sono frequenti le fratture post-traumatiche o spontanee e fenomeni di necrosi asettica della testa del femore, così come dolori ossei invalidanti. Raramente vi è interessamento polmonare caratterizzato da segni di pneumopatia restrittiva causata dall’infiltrazione ad opera delle cellule di Gaucher con fibrosi interstiziale reattiva. Le analisi di laboratorio evidenziano anemia normocitica e piastrinopenia di grado variabile, alcuni pazienti presentano un lieve aumento delle transaminasi e della bilirubina, spesso si evidenzia un aumento dei tempi di coagulazione e la riduzione di alcuni fattori di coagulazione e di inibitori trombotici, inoltre si riscontrano incremento di chitotriosidasi, della fosfatasi acida, del lisozima e dell’enzima di conversione dell’angiotensina.

La diagnosi viene sospettata per la presenza di cellule di Gaucher nell’aspirato midollare, la conferma si ottiene con il dosaggio enzimatico su leucociti o fibroblasti in coltura.

Per questa forma esiste un trattamento terapeutico specifico che consiste nell’utilizzo di terapia enzimatica sostitutiva, la cui trattazione è rinviata ai successivi capitoli.

La malattia di Gaucher **tipo II** esordisce intorno ai 3 mesi di vita con splenomegalia imponente e sintomi neurologici contraddistinti dalla caratteristica triade opistotono, strabismo e trisma. La morte sopraggiunge nei primi due anni d’età.

La malattia di Gaucher **tipo III** ha il suo esordio nella prima decade di vita con splenomegalia associata a progressivo coinvolgimento neurologico consistente nella presenza di nistagmo, strabismo, oftalmoplegia; a ciò seguono aggressività, deterioramento delle funzioni cognitive, disturbi del movimento fino ad arrivare a tetraparesi ed epilessia di tipo mioclonico farmaco resistente. Recentemente è stata proposta un’ulteriore suddivisione della Gaucher tipo III in ulteriori tre sottotipi:

- tipo IIIa: gravi manifestazioni neurologiche e lieve coinvolgimento somatico
- tipo IIIb: importante visceromegalia, lieve sintomatologia neurologica
- tipo IIIc: opacità corneale, aprassia oculomotoria, modesta visceromegalia e calcificazione delle valvole cardiache.

Malattia di Niemann-Pick

La malattia di Niemann-Pick è causata dall’accumulo di sfingomieline dovuto alla mutazione a carico del gene che codifica per la sfingomielinasi, e che mappa sul cromosoma 11 (11p15.1-p15.4.) Le mutazioni conosciute sono 12 e tra esse la B496 L, la L302 P e la fs P330 sono da sole responsabili del 92% dei casi di Niemann-Pick negli ebrei Ashkenazy. Come per la malattia di Gaucher, anche in quella Niemann-Pick sono presenti delle cellule, dette appunto di Niemann-Pick, caratterizzate da aspetto schiumoso con citoplasma ripieno di goccioline birifrangenti e nucleo situato in posizione eccentrica. Il riscontro di tali elementi cellulari nello striscio periferico può fare sospettare la malattia che però si diagnostica solo in seguito a dosaggio enzimatico nei fibroblasti.

Clinicamente la Niemann-Pick si presenta in due diverse forme A e B.

La **Niemann-Pick tipo A** esordisce alla nascita o entro i primi 6 mesi di vita, ha decorso acuto ed è contraddistinta da epatosplenomegalia, infiltrazione a carico dell’interstizio polmonare (alla Rx aspetto reticolare o granulare), rifiuto dell’alimentazione associato a vomito e diarrea con conseguente quadro di distrofia e malnutrizione. Nel 50% dei casi è presente degenerazione retinica con presenza di macchia rosso ciliegia a livello maculare; la compromissione neurologica non sempre è evidente nelle fasi iniziali, perché questi bambini pur avendo uno

sviluppo globalmente ritardato hanno la capacità di stare seduti, in piedi e di apprendere altre capacità. Tuttavia man mano che la patologia progredisce si rende evidente la mancata acquisizione di nuove abilità associata alla regressione di quelle presenti; diminuisce la forza muscolare fino ad arrivare all'ipotonia. La morte giunge prima del 4° anno di vita.

La **Niemann-Pick tipo B** ha decorso subacuto, si manifesta con splenomegalia che esordisce nei primi anni di vita, vi possono inoltre essere dispnea e infezioni respiratorie ricorrenti che denotano l'interessamento polmonare. Il coinvolgimento neurologico può essere del tutto assente o manifestarsi con atassia cerebellare, ritardo mentale o manifestazioni retiniche quali macchia rosso ciliegia o decolorazione grigiastra della macula.

In queste due forme la diagnosi viene confermata dal dosaggio dell'enzima carente sui leucociti o nei fibroblasti coltivati.

Esistono altre due forme di Niemann-Pick la tipo C e la tipo D dovute non al deficit della sfingomielinasi, ma ad un difetto del trasporto del colesterolo esogeno con accumulo lisosomiale di sfingomielina, fosfolipidi e colesterolo non esterificato. L'alterazione di questa via catabolica è dovuta da mutazioni a carico del gene codificante mappato sul cromosoma 18.

Le manifestazioni cliniche sono eterogenee: nella forma **tipo C** abbiamo un normale sviluppo fino ai 2-3 anni di vita, successivamente compaiono epatosplenomegalia, oftalmoplegia sopranucleare verticale, atassia progressiva, distonia e convulsioni. I bambini affetti presentano una ingravescente invalidità fisica e psichica, inoltre raggiunta la pubertà si slatentizzano turbe psichiche, infine sopraggiungono rigidità e spasticità. L'exitus avviene nella seconda decade di vita.

La Niemann-Pick **tipo D** si presenta con un fenotipo meno grave rispetto alla precedente e pare che sia molto comune in Scozia.

La diagnosi si fa mediante misurazione della capacità di esterificare il colesterolo, e tramite dimostrazione dell'accumulo tissutale di colesterolo libero con difetto di formazione di esteri del colesterolo nei fibroblasti coltivati dopo carico di LDL.

La terapia, esclusivamente sintomatica, è volta al trattamento delle convulsioni della distonia e dei presidi terapeutici per la riduzione del tasso di colesterolo epatico.

Malattia di Fabry

Differentemente dalle altre LSDs è ad eredità X-linked. Il difetto enzimatico consiste nella carenza della α -galattosidasi A, il cui gene è situato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq22). È una patologia considerata rara, ma certamente la sua incidenza è sottostimata, in quanto ancora poco nota a tutti gli specialisti coinvolti (cardiologi, nefrologi, ematologi, dermatologi). La malattia può esordire nella prima decade di vita inizialmente con lesioni cutanee tipo angiocheratomi che si localizzano alla radice delle cosce e in regione periombelicale (disposizione a costume da bagno). Tipiche manifestazioni della malattia sono le crisi dolorose a carico delle estremità causate dall'accumulo degli sfingolipidi nell'endotelio vascolare che irrori i nervi periferici; successivamente compaiono episodi tipo stroke con manifestazioni neurologiche focali, segni oculari (tortuosità dei vasi congiuntivali, opacità corneale, cataratta), sintomi renali (proteinuria, poliuria fino al sopraggiungere di insufficienza renale), coinvolgimento del sistema cardiovascolare con dolori precordiali, insufficienza cardiaca. L'exitus è spesso la conseguenza diretta dell'insufficienza renale. Le donne portatrici possono essere paucisintomatiche (alterazioni corneali). La diagnosi viene fatta con dosaggio enzimatico su leucociti o fibroblasti. La terapia è sintomatica per ciò che riguarda le crisi dolorose, mentre per l'insufficienza renale a volte è necessario ricorrere al trapianto d'organo. Oggi è disponibile la terapia enzimatica sostitutiva (ERT)

.

Leucodistrofia metacromatica

È una malattia dovuta al deficit di arilsulfatasi-A o del suo specifico attivatore, ciò comporta accumulo di cerebroside-solfato a carico del sistema nervoso centrale e periferico, nel rene e nella colecisti. Il gene che codifica per l'arilsulfatasi-A si trova sul cromosoma 22 (22q13).

Si distinguono diverse forme di leucodistrofia metacromatica, in base all'età di esordio e sono: forma tardo-infantile, forma giovanile, forma dell'adulto. Vi è anche una forma causata dal difetto dell'attivatore dell'arilsulfatasi A (SAP-1, Saposina B) il cui gene è stato mappato sul cromosoma 10. Di recente sono stati anche individuati dei soggetti che presentano una pseudo deficienza di arilsulfatasi-A.

La **forma tardo-infantile** è la più grave e comune, si manifesta intorno al 2° anno di vita con disturbi della deambulazione, ipotonia assiale a cui si associa poi una progressiva ipertonìa a carico degli arti inferiori senza che però sia presente iperelicitabilità dei rotulei e questo succede poiché contemporaneamente si instaura un quadro di neuropatia periferica; quest'ultima, a volte, può rappresentare il sintomo d'esordio e restare isolata per diversi mesi portando ad una erronea diagnosi di neuropatia periferica degenerativa o di poliradicoloneurite cosa che viene supportata dall'elevato riscontro di proteine nel liquor e dalla riduzione della velocità di conduzione nervosa sia sensitiva che motoria associata a riduzione dei potenziali evocati. A questi sintomi si aggiungono strabismo, atrofia del nervo ottico e degenerazione grigiastra della macula, deterioramento mentale che però è tardivo, intorno ai 4 anni ci si ritrova di fronte a un quadro di tetraparesi. La morte sopraggiunge entro la prima decade di vita.

La **forma giovanile** esordisce tra i 4 e i 10 anni spesso i primi sintomi sono deterioramento mentale e disturbi del comportamento a cui si associano in seguito incontinenza, ipertonìa e tremori. Nel corso della malattia il paziente presenta una progressiva paralisi con rigidità agli arti e tremori.

La **forma dell'adulto** inizia in epoca adolescenziale o anche più tardi e, di solito, i sintomi d'esordio sono dati da turbe comportamentali, scarso rendimento scolastico, labilità emotiva, perdita della memoria; successivamente compaiono distonia, paresi, nistagmo orizzontale e atrofia ottica.

La **forma da deficit dell'attivatore enzimatico** è rarissima finora ne sono stati descritti solo 6 casi. Vi si riscontra una normale attività dell'enzima ma un'eccessiva escrezione urinaria di sulfatidi, per farne diagnosi è necessario confrontare le cellule dei pazienti con anticorpi verso la Saposina B.

La diagnosi di leucodistrofia metacromatica si basa sul dosaggio enzimatico nei leucociti o fibroblasti in coltura e sulla aumentata escrezione urinaria di sulfatidi. Di ausilio diagnostico può essere il quadro della RM encefalo che mostra ipodensità della sostanza bianca specie a livello periventricolare.

Dal punto di vista terapeutico attualmente l'unica possibilità è rappresentata dal trapianto di midollo che però ha dato buoni risultati nei casi in cui è stato possibile fare una diagnosi precoce tale da impedire un'eccessivo accumulo di metaboliti a carico del SNC; tale pratica ha permesso di ottenere un rallentamento nella progressione della malattia.

Leucodistrofia di Krabbe

È una malattia neurodegenerativa caratterizzata dal deficit di β -galattocerebrosidasi che comporta a sua volta accumulo di galattocerebroside e galattosil-sfingosina nel SNC con compromissione del turnover e del catabolismo della mielina. L'alterazione genetica è a livello del cromosoma 14 (q24-32).

Clinicamente abbiamo una forma infantile, una tardo infantile, una giovanile.

La **forma infantile** molto frequente nei paesi del nord Europa, esordisce intorno ai 3-6 mesi di vita, con arresto dello sviluppo psicomotorio, irritabilità e ipersensibilità agli stimoli esterni. Molto presto si instaurano opistotono e ipertonìa con assenza dei riflessi rotulei per la

concomitante neuropatia periferica, sono inoltre presenti atrofia ottica, convulsioni e iperprotidorrachia. Raramente questi pazienti sopravvivono oltre i 2 anni.

La **forma tardo infantile**, particolarmente frequente in Sicilia, esordisce dopo i 2 anni ma prima dei 5 con segni neurologici focali come emiparesi, diplegia spastica, atassia cerebellare, riduzione del visus, progredisce poi verso la tetraparesi spastica e la progressiva perdita delle funzioni intellettive. Nella fase terminale i pazienti sono costretti a letto, presentano cecità, assenza del linguaggio e difficoltà della masticazione e della deglutizione, purtroppo il decorso della malattia è infausto e la sopravvivenza massima varia dai 2 ai 7 anni dall'età d'esordio.

Il quadro della RM encefalo è caratterizzato, nella forma infantile, dalla presenza di aree di ipodensità a livello dei talami e dei nuclei dentati associati a lesioni iperintense localizzate sulla sostanza bianca periventricolare e nel cervelletto.

Nella forma tardo infantile invece la RM encefalo mostra lesioni della sostanza bianca a carattere simmetrico e confluyente che progrediscono dalle regioni parieto-occipitali verso le fronto-temporali e dalle aree sub-ependimali a quelle sottocorticali.

La **forma dell'adulto** è molto rara e generalmente presenta segni di degenerazione spinocerebellare, inoltre ha un decorso particolarmente lento.

La diagnosi di leucodistrofia di Krabbe si ottiene dosando l'attività dell'enzima carente nei leucociti e nei fibroblasti.

Mucosulfatidosi (malattia di Austin)

Si tratta di una patologia piuttosto rara dovuta al deficit delle arilsulfatasi A B e C così come della sulfatasi dei mucopolisaccaridi, per cui, nei soggetti affetti, abbiamo l'accumulo di sulfatidi, mucopolisaccaridi e colesterolo solfato a carico sia del SNC sia degli organi ipocondriaci.

Clinicamente questi pazienti presentano facies grossolana, ittiosi cutanea, visceromegalia e anomalie scheletriche varie a cui si associa un progressivo deterioramento psicomotorio.

Malattia di Farber

Dovuta al deficit di ceramidasi comporta accumulo di ceramide nei lisosomi, esordisce nelle prime settimane di vita con tumefazione articolare e comparsa di noduli sottocutanei dolenti ed eritematosi. Le articolazioni più coinvolte sono le interfalangee, le radio-carpiche e quelle della colonna vertebrale. Spesso questi soggetti presentano un pianto roco dovuto alla formazione di noduli sulle corde vocali. Vengono inoltre coinvolti polmoni, cuore linfonodi e SNC.

Glicoproteinosi

Le glicoproteine sono molecole composte da catene oligosaccaridiche legate a catene polipeptidiche. Esse vengono sintetizzate nel reticolo endoplasmico rugoso e da qui portate all'apparato del Golgi dove originano i lisosomi. È proprio nei lisosomi che avviene la demolizione delle glicoproteine ad opera di enzimi specifici che sono: α -fucosidasi, α -mannosidasi, β -mannosidasi, β -esosaminidasi, aspartil-glucosaminidasi, sialidasi. Il difetto di ognuno di questi enzimi provoca accumulo intralisosomiale di glicoproteine.

α -fucosidosi

La carenza dell' α -fucosidasi determina accumulo intralisosomiale di fuco-gliconiugati. Il gene responsabile si trova sul braccio corto del cromosoma 1 (1p34-p36). La malattia che ne deriva è piuttosto rara e si manifesta con fenotipo più o meno grave a secondo dell'età d'esordio.

La **forma più grave** è presente fin dai primi mesi di vita con manifestazioni a carico delle vie respiratorie a cui seguono ipotonia generalizzata e lento progressivo ritardo psicomotorio; intorno ai 2 anni si instaurano ipertonia e rigidità decerebrata. Spesso questi soggetti presentano dismorfismo facciale, modesta visceromegalia, cute spessa, abbondante sudorazione e in alcuni di essi è possibile riscontrare aumento del contenuto di Na e Cl nel sudore. La morte avviene intorno ai 5 anni.

La **forma meno grave** si evidenzia dopo i 2-3 anni d'età con compromissione psicomotoria, dimorfismo facciale, displasia scheletrica (vertebre, costole, bacino, ossa lunghe), angiocheratoma di scroto, natiche, cosce, dorso, tortuosità dei vasi retinici e più raramente retinite pigmentosa.

La diagnosi, così come per le altre LSDs, viene effettuata dosando l'attività enzimatica su leucociti o fibroblasti coltivati e nel riscontro urinario di oligosaccaridi ricchi in fucosio. La terapia consiste nel trapianto di midollo osseo.

α -mannosidosi

In questa patologia la carenza enzimatica comporta accumulo di oligosaccaridi ricchi di mannosio. Il gene codificante si trova sul cromosoma 19. Le manifestazioni cliniche prevedono la suddivisione in forme di tipo I e forme di tipo II.

La forma di **tipo I** fa il suo esordio nei primi anni di vita con compromissione psicomotoria, facies grossolana, epatomegalia, disostosi multipla, sordità, opacità di cornea e cristallino. La morte avviene fra i 3 e i 10 anni.

La forma **tipo II** ha esordio durante l'adolescenza e si manifesta con deterioramento neurologico e più lievi alterazioni somatiche.

La diagnosi si fa mediante dosaggio dell'attività enzimatica.

β -mannosidosi

È una malattia molto rara che nei casi più gravi comporta grave regressione psicomotoria con tetraplegia, convulsioni ed exitus nei primi due anni di vita. Esiste anche una forma più lieve con sordità lieve dimorfismo facciale, lievi alterazioni scheletriche e moderato ritardo mentale con possibilità di sopravvivenza fino all'età adulta.

Aspartilglucosaminuria

Comporta accumulo di aspartilglucosamina. Il gene codificante è mappato sul cromosoma 4. Questa malattia è particolarmente frequente in Finlandia, ma ne sono stati diagnosticati 8 casi in Italia di cui 4 solo in Sicilia.

I bambini affetti, nel primo anno di vita, presentano frequenti infezioni delle vie respiratorie, epatomegalia, ripetuti episodi diarroici, ritardo di crescita, lineamenti del viso grossolani, alterazioni scheletriche a carico soprattutto dei corpi vertebrali. Presentano anche ritardo della deambulazione e dei primi fonemi, ipotonia muscolare e ritardo mentale che è moderato fino a 10 anni, dopo di che diventa grave. La sopravvivenza fino ad età adulta è possibile.

Sialidosi

Dovuta al deficit di sialidasi, questa malattia esiste in due diverse forme.

Tipo I ad esordio dopo i 6 anni, prevede la progressiva riduzione del visus per la presenza di macchia rosso ciliegia, tale handicap diventa progressivo fino all'instaurarsi di cecità notturna. La malattia può limitarsi a sintomi oculari o complicarsi con convulsioni di tipo mioclonico o generalizzate, con iperreflessia, con incoordinazione motoria, con nistagmo, con ipotonia. Non sempre è presente deterioramento intellettivo e quando si instaura è di grado lieve.

Tipo II rispetto alla precedente già nei primi anni sono presenti dimorfismo facciale, cute spessa, ipertricosi, epatomegalia, dispostosi multipla, ernia inguinale e ombelicale, sordità, progressivo rallentamento dello sviluppo psicomotorio. In seguito si instaurano atassia, opacità corneale e del cristallino, convulsioni, grave ritardo mentale. Questi pazienti sopravvivono fino ad età adulta (seconda decade).

Malattie da accumulo di glicogeno (Glicogenosi tipo II)

La glicogenosi tipo II è l'unica fra le glicogenosi dovuta al deficit di un enzima lisosomiale: la maltasi acida o α -1-4-glucosidasi che è principalmente espresso a livello muscolare. Il gene codificante di questa proteina si trova sul braccio lungo del cromosoma 17. Questa malattia esiste in due forme cliniche una ad esordio molto precoce (Malattia di Pompe) e l'altra che colpisce bambini più grandi e gli adulti; gli studi clinici condotti hanno mostrato come nell'ambito della stessa famiglia non sia possibile avere la coesistenza delle due forme, inoltre pare che nella malattia di Pompe l'enzima coinvolto abbia un'alterazione strutturale, mentre nella forma dell'adulto l'enzima pur essendo strutturalmente valido sia ipoespresso nei tessuti.

Nella **malattia di Pompe** i pazienti, sin dalla nascita, presentano grave ipotonia generalizzata, epatosplenomegalia, macroglossia, cardiomiopatia ipertrofica dilatativa che unitamente all'insufficienza respiratoria li porta a morte entro il primo anno di vita.

La forma con coinvolgimento prevalentemente miopatico ad insorgenza tardiva (late onset), ha un quadro clinico sovrapponibile a quello della distrofia muscolare di Duchenne o Becker, infatti i pazienti presentano scarsa resistenza agli sforzi fisici, e progressiva debolezza muscolare. Si riscontrano elevati livelli di CK che impongono l'esecuzione di biopsia muscolare con conseguente formulazione della diagnosi. In alcuni casi la malattia è compatibile con una normale sopravvivenza che richiede solo uno stile di vita più sedentario, in altri soggetti però purtroppo la morte subentra intorno alla 3°- 4° decade di vita per insufficienza respiratoria.

Esiste in atto la possibilità di trattare questi soggetti con terapia enzimatica sostitutiva la cui discussione viene rinviata ai successivi capitoli.

Malattie dovute ad alterato trasporto degli enzimi lisosomiali nei lisosomi

A questo gruppo appartengono le Mucopolipidosi tipo II e III dovute non alla carenza di un singolo enzima, ma all'alterato trasporto degli enzimi stessi all'interno dei lisosomi a causa della mancanza di una fosfo-transferasi che è un enzima che catalizza la fosforilazione di residui di mannosio presenti sulle catene oligosaccaridiche dei precursori degli enzimi lisosomiali. Il gene codificante per la fosfo-transferasi si trova sul cromosoma 4 (4q21-23). La diagnosi si ottiene con il dosaggio degli enzimi lisosomiali che sono aumentati nel siero di oltre 10 volte i valori normali, mentre si trovano notevolmente ridotti all'interno dei fibroblasti in coltura, dove sono presenti delle caratteristiche inclusioni citoplasmatiche. Dal punto di vista terapeutico non esiste ancora un

trattamento specifico per cui al momento sono possibili solo trattamenti ortopedici e medici quanto più efficaci possibile.

Mucopolipidosi II. Detta anche “I cell disease” per la presenza di caratteristiche inclusioni citoplasmatiche nei fibroblasti dei soggetti affetti. Si manifesta già alla nascita con aspetti clinici che ricordano sia la Malattia di Hurler che la GM1. I soggetti affetti presentano: facies grossolana, iperplasia gengivale (tipica di questa malattia), epatosplenomegalia, ernia inguinale e ombelicale, displasia scheletrica (quadro radiologico contraddistinto da: vertebre a uncino, a cuneo, cifosi, coste larghe, metacarpi corti e tozzi, ali iliache ipoplasiche deformate e ovoidali), contratture articolari, fratture congenite multiple, proprio per la presenza di queste ultime spesso si fa erroneamente diagnosi di osteogenesi imperfetta. In seguito si evidenzia ritardo psicomotorio di grado variabile e notevole ritardo di crescita staturo-ponderale con imponenti dismorfismi scheletrici. La morte per insufficienza cardio-respiratoria avviene entro la prima decade di vita.

Mucopolipidosi III. Si manifesta con un fenotipo più lieve rispetto alla precedente. I primi evidenti sintomi si riscontrano tra i 3 e i 5 anni con contratture articolari che determinano impossibilità ad estendere le dita delle mani e rigidità delle spalle, questo comporta deformità delle mani ad artiglio e comparsa di cifoscoliosi; sono inoltre presenti ritardo di crescita con conseguente bassa statura (nanismo), lineamenti grossolani del viso, cute spessa, opacità corneale, displasia scheletrica anche se meno grave rispetto ai soggetti affetti dalla forma II. E' spesso presente distruzione dell'articolazione dell'anca e questo comporta una caratteristica andatura ondeggiante dei pazienti; può o meno essere presente lieve ritardo mentale. L'evoluzione clinica avviene molto più lentamente, infatti, alcuni soggetti arrivano fino all'età adulta.

Malattie dovute ad alterato trasporto dei substrati nei lisosomi

A questo gruppo appartengono la cistinosi e la malattia da accumulo di acido sialico.

Cistinosi

Molto rara dovuta ad accumulo di cistina libera in forma di cristalli intralisosomiali, soprattutto a carico di reni, midollo osseo, cornea e congiuntiva. Il gene codificante è stato mappato sul braccio lungo del cromosoma 17.

Esistono una **forma infantile o nefropatica** di cistinosi che clinicamente si manifesta dopo il primo anno di vita con tipici segni di tubulopatia, perdita con le urine di glucosio, aminoacidi, bicarbonato, fosfato e acqua, con conseguente disidratazione, acidosi, grave ritardo di crescita e conseguente sviluppo di insufficienza renale. Si hanno inoltre deficit del visus per lesioni corneali e retiniche, diabete mellito, insufficienza pancreatica e nei pazienti che raggiungono l'età adulta ipogonadismo. Accanto a questa abbiamo la **forma adolescenziale o intermedia** che esordisce nella seconda decade con lieve coinvolgimento renale e lenta evoluzione. Infine c'è la **forma dell'adulto** che è benigna e non causa insufficienza renale, e dove i cristalli di cistina si localizzano solo a carico della cornea.

La diagnosi viene fatta con la dimostrazione di cristalli di cistina nella cornea attraverso l'esame dell'occhio con la lampada a fessura, tali cristalli sono ben visibili anche nell'aspirato midollare e nei fibroblasti in coltura. La terapia consiste nell'utilizzo di chelanti della cistina e precisamente l'aminotial-cisteamina, che permette di prevenire i danni oculari e renali, coloro che invece hanno insufficienza renale devono essere sottoposti a dialisi ed eventualmente trapianto di reni.

Malattia da accumulo di acido sialico

Ne esiste una **forma grave infantile** che è evidente già alla nascita con facies grossolana epatosplenomegalia imponente, ascite, disostosi multipla, grave ritardo psicomotorio morte per insufficienza cardio-respiratoria entro i primi anni di vita.

La **malattia di Salla** (dal nome della zona finlandese dove è stata diagnosticata), rappresenta il fenotipo più lieve, poiché si manifesta nel primo anno di vita con ipotonia e ritardo psicomotorio progressivo a cui seguono con il passar del tempo atassia, spasticità, atetosi e grave RM. La sopravvivenza di questi soggetti arriva anche ai 60 anni.

La diagnosi si basa sulla dimostrazione di ipersecrezione urinaria di acido sialico (10-100 volte i normali valori).

Malattie da difetto di degradazione di altri substrati.

Malattia di Wolman e malattia da accumulo degli esteri del colesterolo

Sono malattie caratterizzate dalla carenza della lipasi acida lisosomiale che idrolizza gli esteri del colesterolo legati a varie lipoproteine a bassa densità pinocitate dalle cellule. Il deficit di questo enzima determina accumulo massivo di esteri del colesterolo e trigliceridi in diversi tessuti dell'organismo, determinando così due differenti quadri fenotipici. La diagnosi si ottiene con il dosaggio della lipasi acida nei fibroblasti.

Malattia di Wolmann esordisce nelle prime settimane di vita con vomito incoercibile, epatosplenomegalia, steatorrea, distensione addominale ritardo di crescita, calcificazione delle ghiandole surrenali (segno patognomonico) ed exitus entro i 12 mesi.

Malattia da accumulo degli esteri del colesterolo ha decorso meno grave e si manifesta con epatosplenomegalia, iperbetalipoproteinemia aterosclerosi precoce. Non esiste una terapia specifica, ma la somministrazione di colestiramina e di inibitori dell'enzima 3-idrossi-3-metil-glutaril-CoA redattasi al dosaggio di 20 mg/die, associati a dieta a basso contenuto lipidico permette un miglioramento dei sintomi.

Picnodisostosi

Questa malattia è una osteocondrodisplasia dovuta al deficit di catepsina K, una proteasi lisosomiale che ha la più elevata espressione negli osteoclasti. Si manifesta con nanismo, fragilità ossea, acroosteolisi, delle falangi distali, displasia della clavicola e ritardo di chiusura delle suture craniche.

Malattia di Schindler

Si tratta di una malattia dovuta al deficit dell'enzima α -N-acetilgalattosaminidasi il cui gene codificante è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 22 (22q13.1-13.2). La carenza enzimatica è responsabile di accumulo di glicopeptidi sialilati e asialilati. Ciò determina un quadro di distrofia assonale che clinicamente si manifesta o precocemente o in età adulta.

La **forma infantile** si manifesta dopo i primi 9-15 mesi di apparente normalità a cui segue una fase di rapida e progressiva neurodegenerazione, cecità corticale e comparsa di convulsioni di tipo mioclonico intorno ai 4 anni.

La **forma dell'adulto** è stata osservata finora solo in una donna di 46 anni che presentava discreto ritardo mentale e angiocheratoma diffuso.

In entrambi i casi la diagnosi consiste nella dimostrazione della carente attività enzimatica nei leucociti del sangue periferico e nei fibroblasti in coltura.

TERAPIA

La scoperta della patogenesi delle LSDs fu accompagnata dalla ottimistica previsione che, alcune di esse potevano essere trattate con enzimi esogeni capaci di raggiungere i lisosomi per endocitosi [4](#). Questa speranza fu alimentata dalla scoperta che gli enzimi sostitutivi funzionavano molto bene nei modelli in vitro. Fu dimostrato che il catabolismo dei GAG nei fibroblasti coltivati dei pazienti affetti da MPS poteva essere normalmente ripristinato con l'aggiunta di specifici fattori correttivi al terreno di coltura [5](#). Si è poi scoperto che tali fattori, altro non sono che gli enzimi lisosomiali carenti, che hanno come marker di riconoscimento un mannosio-6-fosfato, capace di determinare endocitosi recettore mediata all'interno dei lisosomi. Su queste prime osservazioni si è basato lo sviluppo della terapia specifica per le LSDs. Gli enzimi carenti possono essere somministrati direttamente (Enzyme Replacement Therapy o ERT), indirettamente (trapianto di midollo osseo o BMT), o ancora tramite cellule autologhe geneticamente modificate per sovraesprimere l'enzima carente (terapia genica) in modo tale da liberare i depositi lisosomiali nelle cellule dei pazienti affetti [6-7-8](#). Qualunque sia l'approccio terapeutico utilizzato, il principio è il medesimo e cioè fornire alle cellule dei pazienti affetti quantità di enzima tali da determinare un impatto clinico significativo sulla progressione della malattia, e per quelle forme con maggiore interessamento del sistema nervoso centrale, permettere a tali enzimi di raggiungere lo stesso. Recentemente è stato introdotto un nuovo approccio per il trattamento di queste patologie che è denominato "terapia di riduzione del substrato (SRT)", basata sull'inibizione dell'enzima principalmente coinvolto nella biosintesi del prodotto che viene poi accumulato all'interno dei lisosomi.

Di seguito verranno delineate in dettaglio le singole strategie terapeutiche.

TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO

Nel 1981 Hobbs e collaboratori, dimostrarono un'importante riduzione delle manifestazioni somatiche in un soggetto di 9 anni affetto da malattia di Hurler e sottoposto a trapianto di midollo osseo [9](#). Da allora più di 200 pazienti affetti da LSDs (soprattutto MPS I), sono stati sottoposti a trapianto di midollo osseo allogenico, e più recentemente a trapianto di cellule staminali (HSCT). I primi risultati sperimentali si sono rivelati incoraggianti, infatti nel caso delle MPS si è riscontrata una riduzione sia dei GAG urinari che liquorali dopo qualche mese dal trapianto; nel caso della MPS I l'attività della α -iduronidasi passa dal 3 al 10 % dopo un anno dal trapianto [10](#). Si è anche notato che sia le cellule del Kupffer sia gli epatociti di soggetti affetti da MPS I, II, e VI subiscono un processo di depurazione dall'accumulo di GAG in seguito al trapianto [11](#). A tutto ciò si è unito il miglioramento delle manifestazioni cliniche (riduzione dell'epatosplenomegalia, riduzione dei lineamenti grossolani del volto, mantenimento di normale funzione cardiaca, miglioramento della capacità uditiva) e una sopravvivenza maggiore. Tuttavia dopo il trapianto non si nota miglioramento della displasia scheletrica, sia a causa del precoce instaurarsi della stessa, sia perché dopo il trapianto molti soggetti (specie quelli affetti da MPS IH) presentano un incremento della sintomatologia dolorosa articolare associata a rigidità, sindrome del tunnel carpale, compressione del midollo spinale e peggioramento della cifosi toraco-lombare, probabilmente dovute alla

aumentata sopravvivenza post-trapianto **12**. Per ciò che riguarda le manifestazioni oculari, molti soggetti con MPS non presentano miglioramento dell'opacità corneale, né tuttavia peggioramento **13**.

HSCT, è stato utilizzato anche in pz affetti da α -mannosidosi, leucodistrofia metacromatica e malattia di Krabbe, trapiantati prima dell'insorgenza di segni di coinvolgimento a carico del SNC o SN periferico, con risultati promettenti, ma ancora in fase di studio.

Diverso è il discorso per ciò che riguarda gli effetti del HSCT sul S.N.C., è stato infatti riscontrato che nei soggetti affetti da MPS IH trapiantati prima del compimento del 2° anno e con un Q.I. uguale o superiore a 70 non si assiste al deterioramento mentale che è invece previsto dal decorso della malattia. Pare che questo sia dovuto al fatto che le cellule della microglia del S.N.C., essendo di origine midollare, rappresentano la sorgente produttiva di enzima carente dopo il HSCT. Di contro però si visto che pazienti affetti da forma grave di MPS II o III e soggetti affetti da MPS IH con marcato ritardo dello sviluppo pre-trapianto, non hanno alcun beneficio a livello intellettivo, post trapianto anche se quest'ultimo viene effettuato prima dei 24 mesi, non sono però ancora chiare le ragioni di ciò **14**.

In generale possiamo dire che, l'esito clinico del HSCT nei soggetti affetti da MPS è piuttosto variabile e dipende dal grado di interessamento clinico della malattia e dall'età del paziente all'epoca del trapianto. Gli scarsi risultati ottenuti a livello di attecchimento delle cellule trapiantate e il rischio di reazione immunologica da trapianto (graft-versus-host-disease), rappresentano un ostacolo al buon esito del HSCT in numerosi pazienti, comportando un elevato rischio di morbilità e mortalità. Nonostante il HSCT modifichi il decorso clinico della malattia, migliorandone la qualità di vita in molti pazienti, si tratta pur sempre di una terapia palliativa che è capace di migliorare le alterazioni somatiche, fatta eccezione per quelle oculari scheletriche e articolari, ma che non garantisce in tutti i soggetti un esito positivo a livello neurologico.

In conclusione il HSCT dovrebbe essere limitato solo a quei casi accuratamente selezionati, dopo un'attenta valutazione clinica e un'approfondita consulenza pre-trapianto, a cui associare un duraturo e sistemico monitoraggio dei risultati ottenuti.

TERAPIA DI RIDUZIONE DEL SUBSTRATO (SRT)

Si è detto che un nuovo approccio al trattamento delle LSDs è rappresentato dalla terapia di riduzione del substrato (SRT), che si basa sull'inibizione dell'enzima principalmente coinvolto non nel catabolismo bensì nella biosintesi dei substrati che si accumulano a carico dei lisosomi. Questa tecnica fu proposta nel 1970 ed è stata clinicamente attuata nelle sfingolipidosi. Questo tipo di terapia si basa sull'utilizzo di piccole molecole idrofobe che penetrano nelle cellule attraverso le membrane cellulari e, una volta all'interno, agiscono su organuli intracellulari come il reticolo endoplasmico dove avvengono i principali processi di biosintesi. L'efficacia terapeutica della riduzione del substrato, dipende dall'attività enzimatica residua capace di idrolizzare le molecole accumulate. L'utilizzo di queste molecole idrofobe è inoltre vantaggioso in quanto esse possono essere facilmente sottoposte a modifiche chimiche che ne garantiscono la migliore selettività ed efficacia terapeutica, oltre a ciò queste molecole hanno un potere di penetrazione all'interno dei tessuti, molto più elevato rispetto a strutture più complesse come gli enzimi.

I primi trials sono stati eseguiti sulle sfingolipidosi. Partendo dall'osservazione che i glicosfingolipidi derivano dall'unione di glucosio a ceramide tramite UDP-glicosiltransferasi, Platt e collaboratori hanno dimostrato in vitro su cellule di Gaucher, che la N-butildeossinogirimicina (Miglustat), inibisce tale processo riducendo l'accumulo intracellulare di glicosilceramide.

Per dimostrare l'efficacia e la sicurezza del miglustat, è stato condotto uno studio su 28 pz adulti affetti da Gaucher, che per vari motivi non potevano essere sottoposti alla ERT.

I pz arruolati nel trial clinico, sono stati trattati per un anno con 100 mg di miglustat 3 volte die e il risultato è stato: riduzione dell'epatosplenomegalia, miglioramento dei parametri ematologici (scomparsa dell'anemia, incremento del numero delle piastrine) e dell'attività della chitotriosidasi plasmatica. Questo studio ha inoltre permesso di dimostrare, oltre all'efficacia, anche la sicurezza del Miglustat dopo 36 mesi di trattamento. Gli eventi avversi più frequentemente registrati sono di tipo gastrointestinale (diarrea, meteorismo) nel 60-80% dei casi associati a perdita di peso, però associando una dieta povera di carboidrati, è stato ridotto tale effetto collaterale. Circa 1/4 dei soggetti esaminati ha lamentato la comparsa di tremori che sono scomparsi spontaneamente durante il trattamento.

Alla fine del 2002 l'EMEA ha rilasciato l'autorizzazione all'immissione in commercio, valida per tutta l'Europa, del medicinale Zavesca che contiene Miglustat. L'indicazione approvata è per il trattamento orale della malattia di Gaucher tipo I con valori di Hb superiore a 9 g/dl e piastrine superiori a $50 \times 10^9/L$ e nessuna evidenza di malattia ossea progressiva, ma il suo utilizzo va limitato ai soggetti che non possono eseguire terapia enzimatica sostitutiva (problemi di accesso venoso, agofobia, motivi religiosi).

Il Miglustat presenta però altri potenziali utilizzi terapeutici oltre alla malattia di Gaucher, in particolare potrebbe risultare efficace nel trattamento di alcune patologie da accumulo neurodegenerative che attualmente sono prive di terapia; questa considerazione è stata ricavata dall'osservazione che in parecchie sfingolipidosi l'accumulo di glicosfingolipidi può essere ridotto inibendo la formazione di glicosilceramide. Sono pertanto stati condotti studi sull'efficacia del miglustat in pz affetti da Gaucher tipo 3, in trattamento enzimatico sostitutivo; il limite di questo studio è che i pz arruolati presentavano manifestazioni cliniche neurologiche troppo eterogenee tra loro, per cui non è facile trarre conclusioni, pertanto il trattamento di questi soggetti con ERT associato a miglustat è considerato ancora sperimentale.

Nel 2009 è stato approvato l'uso dello zavesca nella malattia di Niemann-Pick tipo C perché pare che rallenti la progressione delle manifestazioni neurologiche.

È attualmente in studio un nuovo inibitore della glucosilceramide sintasi, chiamato Eliglustat, che mostra una maggiore specificità per l'enzima rispetto al miglustat, e darebbe meno effetti collaterali di tipo gastrointestinale. È in atto in fase III uno studio randomizzato controllato su pz affetti da GD tipo I trattati e stabilizzati con ERT, che potrebbero proseguire solo con eliglustat la terapia, ciò significherebbe ridurre il numero di infusioni ERT, con relativi costi per il SSN.

Genistein è un isoflavone estratto dai semi di soia che inibisce (ma non blocca) la sintesi dei GAG. In vitro il genistein ha ridotto l'accumulo di GAG nei fibroblasti di pz affetti da MPS I, II, IIIA, IIIB.

Uno studio condotto da Piotrowska et al. Su 10 pz affetti da MPS III A e III B trattati con 5 mg/kg/die per 12 mesi di genistein, ha dimostrato un miglioramento dei livelli di eparan solfato nelle urine, morfologia del capello e funzione cognitiva.

Non sono ancora disponibili i dati sullo studio in doppio cieco condotti dall'università di Amsterdam. 15

TERAPIA GENICA

La necessità di trovare una terapia genica per le LSDs è dovuta sia al fatto che molte di esse sono ancora incurabili (fatta eccezione per i presidi terapeutici palliativi), sia perché quelle tra esse che possono oggi usufruire di ERT, hanno purtroppo il doppio svantaggio dell'eccessivo costo della

terapia e della via di somministrazione e.v. che costringe i soggetti affetti a sottoporsi a infusioni settimanali, con tutte le conseguenze che ciò porta.

Il primo gradino per lo sviluppo della terapia genica è stato quello di costruire vettori virali che trasportino il cDNA codificante per l'enzima carente, all'interno delle cellule. Fatto questo, si doveva dimostrare che la cellula così trasfetta riusciva ad esprimere elevate quantità di enzima diventando donatrice di enzima correttivo in vitro. Il secondo step è stato testare l'efficacia terapeutica di questo modello, condotto in vitro, in vivo su modelli animali di MPS. Il terzo stadio è la sperimentazione su modelli umani.

L'espressione dell'enzima nei fibroblasti carenti dopo la traduzione con cDNA retrovirale corrispondente è stata mostrata per la MPS I, II, IIIA, VI e VII. La traduzione e la conseguente espressione enzimatica sono riuscite nelle cellule emopoietiche e anche nelle cellule progenitrici del midollo osseo (CD3+) di pazienti affetti dalla sindrome di Hurler [16](#) e su cellule epatiche fetali di topi con MPS VII [17](#).

I dati ottenuti su modelli murini di MPS I hanno dimostrato che un mese dopo la singola somministrazione del vettore virale, l'attività enzimatica è aumentata in tutti gli organi degli animali trattati, raggiungendo i valori più alti nel fegato e nella milza (fegato 0,77% dei topi normali; milza 1% del valore trovato nei topi sani). Ora, sebbene l'attività enzimatica ripristinata sia modesta, essa è sufficiente a normalizzare l'accumulo di GAG nelle urine, nel fegato e nella milza, inoltre riduce i GAG accumulati a livello di cuore, reni e polmoni. Analisi mediante PCR condotti sullo stesso modello hanno evidenziato l'integrazione del DNA tradotto dal vettore solo nel fegato e nella milza di questi animali, ciò suggerisce che la correzione della patologia negli altri organi è dovuta alla secrezione dell'enzima ricombinante nel plasma e al suo successivo uptake nei tessuti periferici. A distanza di un mese dall'inizio del trattamento si sono riscontrati anticorpi verso l'enzima ricombinante, che però sembrano non diminuire l'efficacia terapeutica del vettore. Protraendo lo studio per 6 mesi è stato constatato che l'attività enzimatica nel fegato e nella milza era equipollente allo 0, con aumento dei GAG e con livello di anticorpi è estremamente elevato, ma lo studio della PCR ha mostrato che il vettore era ancora integrato nel tessuto epatico e splenico, sia pure in numero di copie ridotto. Per spiegare ciò si pensa che la perdita di espressione del transgene nel tempo sia dovuta ad un meccanismo di clearance delle cellule tradotte ad opera della forte risposta immunitaria contro il transgene.

I dati raccolti per il modello murino di MPS IIIB un mese dopo la somministrazione di una singola dose di vettore, indicano che l'attività enzimatica carente risulta aumentata in fegato, milza, cuore e polmoni, con una prevalenza maggiore nei primi due. I risultati dello studio della PCR mostrano anche in questo caso l'integrazione del vettore a livello epatico, splenico e polmonare. Rispetto però allo studio precedentemente citato, in questo modello sperimentale, a distanza di sei mesi il livello di GAG si mantiene ridotto in fegato, milza, cuore e polmoni, il vettore virale si mantiene ben integrato e funzionante all'interno di tali tessuti, inoltre il livello di anticorpi contro il transgene risulta essere basso o comunque non aumentato a distanza di 6 mesi, rispetto al controllo che viene fatto dopo il 1° mese di trattamento.

Un altro esempio di terapia genica è stato condotto su modello murino di MPS II. In esso gli animali affetti sono stati trasfetti con vettori virali somministrati attraverso la vena della coda, e l'attività enzimatica è stata monitorata settimanalmente per due mesi. I dati raccolti hanno mostrato un aumento dell'attività enzimatica e la riduzione dei GAG urinari. Dopo due mesi dalla somministrazione del vettore virale gli animali sono stati soppressi e lo studio istologico degli organi interni ha mostrato la riduzione dei GAG tissutali e la riduzione della vacuolizzazione cellulare in tutti gli organi esaminati. Dati questi risultati incoraggianti l'esperimento è stato riproposto e condotto per 6 mesi con i medesimi riscontri istologici e di laboratorio, oltre ad un'evidente correzione clinica delle anomalie scheletriche.

È importante sottolineare come in questo modello lo studio autoptico delle cellule del S.N.C. abbia fatto riscontrare una totale mancanza di azione del transgene a livello di questi tessuti; pertanto si sta studiando un modo per somministrare i vettori trasfetti nel fluido cerebrospinale.

Purtroppo non siamo ancora in grado di capire i motivi di questa differenza, ma è chiaro che questi studi rappresentano un incoraggiamento al tentativo di sviluppare terapie geniche efficaci per le LSDs.

Nell'ambito della terapia genica i "neo-organi" rappresentano un nuovo approccio volto a garantire una maggiore sopravvivenza delle cellule geneticamente modificate secernenti l'enzima carente all'interno dell'organismo. Queste cellule modificate vengono rivestite con lattice e chirurgicamente impiantate all'interno della cavità peritoneale, dove devono essere vascolarizzate in modo tale da formare un "neo-organo". Questa tecnica sperimentata su topi e cani affetti da MPS VII ha mostrato una bassa produzione dell'enzima carente, però rivelatasi sufficiente a migliorare l'istologia epatica e splenica. Tali effetti sono stati registrati a distanza di qualche mese dall'impianto. Tuttora si è in attesa di risultati significativi in altri modelli animali sperimentali di LSDs **18**.

Troviamo doveroso citare un altro approccio, anch'esso, ancora in fase sperimentale, che si basa sulla combinazione tra terapia genica (introduzione del gene sano) e terapia cellulare (uso di cellule staminali). Tale combinazione avrebbe lo scopo di ripristinare il difetto metabolico e contemporaneamente riparare i danni tissutali precedentemente instauratisi.

Il modello sperimentale usato è quello dei topi affetti dalla malattia di Tay-Sachs. A questi animali è stato inoculato un vettore erpetico contenente il cDNA HEXA (esosaminidasi-A), nella regione della capsula interna dell'emisfero sinistro del cervello; dopo un mese si è visto che l'attività enzimatica dell'esosaminidasi-A era completamente ristabilita e che il livello di accumulo di GM2 era completamente rimosso. Nonostante ciò era chiaro che il danno tissutale neuronale non poteva essere riparato, ed è qui che entrano in ballo le cellule staminali. Infatti, in questo modello le cellule staminali del midollo osseo sono state isolate ed ingegnerizzate in modo da ristabilire l'attività enzimatica carente, dopo di che sono state marcate e trapiantate in diversi siti del cervello dei topi affetti da TS e si è visto che si sono distribuite uniformemente. Stiamo ancora aspettando di vedere la loro capacità di differenziare verso la linea neuronale in questo modello in vivo, ma il modello in vitro ha dato ottimi risultati.

CHAPERONES

Gli enzimi lisosomiali, sono come si sa, delle proteine, sintetizzate e secrete nel reticolo endoplasmatico; un passaggio fondamentale è il loro ripiegamento, solo dopo essersi ripiegate, le proteine vengono trasportate nell'apparato di Golgi, dove subiscono ulteriori maturazioni che le porteranno a diventare enzima. Se le proteine lisosomiali non si piegano correttamente vengono trattenute dal sistema di controllo qualità del reticolo endoplasmatico detto ERAD (endoplasmatic reticulum associated degradation), che consiste in multipli chaperones che facilitano il corretto ripiegamento degli enzimi permettendogli di essere portati al Golgi per subire maturazioni ulteriori. Le proteine che non risentono dell'azione dell'ERAD vengono portate al citosol e degradate dai proteasomi

Partendo da queste osservazioni si è arrivati alla PCT (pharmacological chaperone therapy), cioè si usano delle molecole dette appunto chaperones che si legano all'enzima lisosomiale mutato del soggetto affetto da LSDs, stabilizzandone la corretta conformazione permettendogli così di arrivare alla destinazione finale cioè il lisosoma, quindi è un approccio terapeutico che potenzia il pool di enzima attivo del soggetto affetto. Un prerequisito fondamentale è che chaperones si può legare solo al sito attivo dell'enzima, quindi l'enzima mutato deve avere una tasca catalitica funzionale, questo accade nei soggetti che hanno mutazioni di tipo missense.

Benjamin et al. hanno studiato l'effetto dello chaperone 1- deossigalattosidasi (migalastat idrocloride) sui livelli di α galattosidasi nei linfoblasti in coltura di maschi affetti da m. di Fabry con

75 differenti mutazioni dissenso. In 49 di questi pz è stata osservato un incremento dell'attività dell' α - galattosidasi dopo 5 giorni di incubazione.

In atto siamo alla fase III di uno studio in doppio cieco condotto su pz affetti da m. Fabry una parte in trattamento ERT, altri non ancora in trattamento al momento dell'arruolamento, le conclusioni della fase II sono che il migalastat è in generale sicuro e ben tollerato, inoltre in 24/26 pz i livelli dell'enzima nei leucociti era aumentato, tale osservazione è supportata anche da una minor quantità di sostanze accumulate riscontrate nella biopsia renale.

Isofagomine (Plicera) è un inibitore del sito attivo della glucocerebrosidasi, che è l'enzima carente della m. di Gaucher, quindi il plicera è chaperone per la GD tipo I, in vitro i risultati sono stati ottimi, ma in atto gli studi in vivo sono ancora in fase di valutazione. 19

TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA

La correzione dei difetti del catabolismo dei GAG è stata realizzata circa 30 anni fa nelle cellule in coltura, tramite la terapia enzimatica sostitutiva (ERT). In seguito sono cominciati i tentativi per realizzare tale processo nei modelli animali, ma ciò ha portato maggiori problemi, come ottenere dai tessuti, per purificazione, quantità di enzima sufficienti e senza la presenza del segnale target di mannosio-6-fosfato che permette all'enzima di penetrare nelle cellule per endocitosi. Questa difficoltà è stata superata solo dopo isolamento del cDNA, cosa che ha reso possibile produrre enzimi ricombinanti. Fortunatamente cellule di mammiferi coltivate, stabilmente trasfette con eccesso di enzimi lisosomiali, secernono quantità elevate di questi ultimi con mannosio-6-fosfato intatto, ciò ha reso più semplice purificare l'enzima dal mezzo di coltura e permetterne la successiva penetrazione all'interno delle cellule target.

I modelli animali quindi si sono mostrati particolarmente utili per esperimenti di ERT.

Sono stati eseguiti test su topi affetti da MPS VII con β -glicuronidasi ricombinante, in cani con MPS I con α -L-iduronidasi, e nei gatti affetti da MPS VI con arilsulfatasi B. In ognuno dei suddetti casi si è ottenuta la rapida riduzione dell'enzima dalla circolazione. La maggior parte dell'enzima arrivava al fegato che veniva velocemente pulito dai vacuoli intralisosomiali, così come reni e milza. Con dosi sufficienti di enzima anche S.N.C. e M.O. mostravano miglioramenti. Non ha stupito che negli animali affetti, il trattamento iniziato alla nascita si sia rivelato più efficace che non se posticipato, per esempio nei gatti affetti da MPS VI si è registrata riduzione della displasia scheletrica.

Gli incoraggianti risultati ottenuti con i modelli animali, hanno permesso di condurre sperimentalmente la ERT in soggetti affetti da MPS I, II e VI.

In tutti gli studi si dimostra una sostanziale modificazione del fenotipo, con correzione o drastica riduzione dei GAG urinari, normalizzazione dell'epatosplenomegalia e miglioramento della motilità articolare, in assenza di effetti collaterali importanti. In tutti i pazienti sottoposti ai trials sperimentali si è riscontrata una risposta anticorpale specifica contro l'enzima ricombinante, che però non ne annulla gli effetti essendo anticorpi non neutralizzanti. È però da sottolineare che si potrebbe verificare reazione anafilattoide acuta che può essere prevenuta tramite somministrazione di antistaminico e riducendo la velocità di infusione. Il problema è che elevati livelli di titolo anticorpale possono determinare una ridotta efficacia della terapia. Un aspetto da non sottovalutare è l'elevato costo di queste terapie, che sono ormai passate dalla fase sperimentale a quella terapeutica legalmente riconosciuta. Di seguito riportiamo i cardini dei trials clinici eseguiti per le LSDs in atto passibili di trattamento con ERT.

La prima ERT sviluppata e approvata per le LSDs è stata quella per la malattia di Gaucher, che si basa sull'uso di imiglucerasi, c'è però da sottolineare che questa terapia è stata approvata ed autorizzata sulla base di uno studio non controllato condotto su 12 pazienti, ciò oggi è praticamente

impossibile perché le nuove terapie richiedono dei criteri di validità, sicurezza ed efficacia molto rigidi.

Attualmente altre LSDs passibili di ERT approvate, sono la malattia di Gaucher, la malattia di Fabry, la MPS I e la MPS VI, si è appena concluso il trials clinico per MPS II con successiva autorizzazione all'uso e registrazione del farmaco 20.

Abbiamo accennato che la prima ERT sviluppata è stata per la *malattia di Gaucher tipo I*. La prima forma enzimatica sviluppata per la terapia fu l'alglucerasi, nome commerciale Ceredase, composta da glucocerebrosidasi di derivazione placentare e mirata ai macrofagi. Nel 1994 negli USA fu approvata la commercializzazione di Cerezyme (imiglucerasi), la cui differenza rispetto al precedente enzima consiste nella sostituzione dell'arginina in posizione 495 con l'istidina. Ma questa modifica dal punto di vista farmacologico non comporta diversità in quanto entrambi gli enzimi hanno la stessa efficacia terapeutica, ciò che però rende preferibile l'imiglucerasi è la sua produzione mediante tecnica ricombinante e non mediante estrazione dal tessuto umano (placenta) come nel caso dell'alglucerasi 21. La tecnica utilizzata per la produzione di imiglucerasi è la stessa che è stata poi applicata per produrre l'enzima sostitutivo per la malattia di Fabry, per la MPS I, per l'insulina, eritropoietina, fattori della coagulazione, ecc.

Il processo di produzione usa una linea cellulare ospite di ovaio di criceto cinese (che si è dimostrata sicura ed efficace per la produzione di enzima), contenente un gene per la glucocerebrosidasi umana, che una volta prodotta viene modificata aggiungendo nella parte glucidica dei residui di mannosio che abbiamo detto sono indispensabili per permettere all'enzima ricombinante di accedere all'interno delle cellule grazie al meccanismo di endocitosi mannosio mediato. Una volta ottenuto, l'enzima viene somministrato per infusione e.v. e si diffonde principalmente alle cellule di discendenza macrofagica. Pare che questi macrofagi siano attratti dalle cellule di Gaucher dei tessuti per via del rilascio di citochine, questo contribuisce quindi ad una efficace e rapida distribuzione dell'enzima nell'organismo 22.

I trials clinico-sperimentali condotti sui pazienti affetti da Gaucher sia con alglucerasi che con imiglucerasi, hanno permesso di dimostrare l'efficacia della terapia enzimatica, infatti a distanza di 6 mesi dall'inizio del trattamento si è riscontrata notevole riduzione dell'epatosplenomegalia, inoltre nello stesso intervallo di tempo alcuni pazienti mostravano segni radiografici di miglioramento osseo (aumento di osso trabecolare nelle aree metafisarie e risoluzione delle frastagliature nell'endostio), a distanza di 9-12 mesi i pazienti mostravano anche una buona ripresa dei parametri ematologici (aumento di Hb e delle Plt). Tutti i pazienti segnalavano aumento delle energie, della forza fisica, maggiore sicurezza e agio nello svolgimento delle attività quotidiane; tutti aumentavano di peso e i bambini crescevano durante il trials. Spossatezza cronica, dolore osseo, epistassi, ecchimosi, gonfiore addominale, sazietà precoce venivano mitigati dal trattamento. Solo 3 pazienti svilupparono anticorpi anti-glucocerebrosidasi durante i primi 9 mesi di studio, essi accusavano capogiri, prurito o esantema lieve, la risposta al farmaco però non veniva diminuita dalla sierconversione e la terapia non veniva interrotta. Un altro effetto collaterale piuttosto comune è rappresentato da disturbi respiratori, mentre raramente sono stati segnalati febbre, nausea, vomito, diarrea, crampi addominali, cefalea e vertigini, tachicardia, ipotensione. In conclusione si può dire che il trattamento con alglucerasi e imiglucerasi è efficace nei confronti della Gaucher e senza differenze significative, l'imiglucerasi è però più sicura per periodi di trattamento prolungati 23.

Il farmaco ha una frequenza di somministrazione bisettimanale e questo perché si è notato, negli studi condotti sui topi, che il 90% dell'enzima viene captato dalle cellule epatiche del Kupffer; queste ultime sarebbero divise in due compartimenti uno a breve emivita, l'altro a lunga emivita (3-4 giorni) localizzato probabilmente nei lisosomi, ciò suggerisce che notevoli quantità di enzima resterebbero all'interno di questa linea cellulare per più tempo consentendo una frequenza di infusione di una volta ogni due settimane.

Il dosaggio consigliato di principio attivo è di 15 U/kg di peso. Ogni flaconcino di prodotto contiene 200 U di enzima che deve essere ricostituito con 5 ml di acqua per preparazioni iniettabili (quindi in

ogni ml di prodotto ricostituito devono essere presenti 40 U di enzima). Una volta ricostituita la soluzione bisogna diluirla in soluzione fisiologica 0.9% di NaCl raggiungendo un volume finale massimo di 100 – 200 ml, successivamente si deve infondere il farmaco e.v. a una velocità non superiore a 1 U per Kg di peso corporeo al minuto.

Per quello che riguarda la *malattia di Fabry* la ERT è stata introdotta nel 2001, dopo uno studio, condotto su una coorte di 800 pazienti reclutati in 11 nazioni europee, che si è basato sulla valutazione clinica e di laboratorio dei soggetti sottoposti al trattamento (algasidase-alpha, 0,2 mg/kg e.v. in 40 minuti ogni due settimane). Il follow-up è stato fatto ogni 3 mesi nel primo anno di trattamento, e successivamente ogni 6 mesi. I parametri presi in considerazione sono stati il danno renale, l'ipertrofia del ventricolo sinistro, il dolore e la qualità di vita. I risultati pubblicati sono relativi a 3 anni di trattamento con ERT 24.

Per ciò che concerne i reni si è osservata una non progressione del danno istologico nei soggetti con lieve o moderata insufficienza renale, mentre sembra che su pazienti affetti da danno renale conclamato la terapia sia inefficace nell'arrestare la progressione della fibrosi e della sclerosi glomerulare 25. L'ipertrofia del ventricolo sinistro ha subito una notevole riduzione già dopo 6 mesi dall'inizio del trattamento e a distanza di 18 mesi dall'inizio della terapia si è continuato a osservare una riduzione dello spessore della parete ventricolare associato ad incremento dell'attività cardiaca 26. L'evidenza dei benefici effetti che l'ERT ha sulla performance cardiache e renali di questi pazienti si riflette positivamente anche sulle complicanze cerebrovascolari cui questi soggetti vanno incontro (stroke) 24.

Fin dall'inizio della terapia i pazienti riferivano un gran miglioramento della sintomatologia dolorosa; inoltre riportavano anche un miglioramento significativo della qualità della vita intesa come miglioramento della deambulazione, delle performance lavorative e delle relazioni sociali. In questo studio solo il 12% dei pazienti ha riportato effetti collaterali da ricondurre all'infusione dell'enzima, tali effetti consistevano in febbre, malessere, rash cutanei, che comunque rispondevano alla temporanea sospensione dell'infusione o alla somministrazione di antistaminici. Eventi avversi seri si sono riscontrati in 38 pazienti, ma è stato dimostrato che non erano legati al trattamento, quanto alla progressione della malattia.

Il nome commerciale dell'enzima ricombinante è Fabrazyme (algasidase- β), deve essere somministrato una volta ogni due settimane per via endovena, alla dose di 1mg/kg di peso corporeo, previa ricostituzione del principio attivo. Ogni flacone di Fabrazyme contiene 35 mg di enzima. Una volta stabilita la dose da somministrare si deve diluire ogni flacone con 7.4 ml di acqua per preparazioni iniettabili in modo da ottenere 5 mg di enzima per ml, dopo la ricostituzione è necessario diluire il prodotto con soluzione fisiologica 0.9% di NaCl fino ad ottenere un volume finale di 500 ml e procedere poi con la somministrazione a 15 mg/ora.

Aldurazyme è il nome commerciale del farmaco utilizzato per la ERT dei soggetti affetti da *MPS I*. In questo caso l'enzima fornito è la α -L-iduronidasi, il trial clinico è stato condotto su 10 pazienti affetti dalla forma lieve di MPS I (fenotipo Scheie o Hurler-Scheie). Nello studio condotto questi 10 pazienti venivano sottoposti all'infusione settimanale di enzima somministrato a 0.5 mg/kg. Dopo 52 settimane di terapia si è ottenuto riduzione dei GAG urinari, riduzione dell'epatosplenomegalia e incremento dell'accrescimento staturale-ponderale, a cui si sono associati migliori performance cardiache e miglioramento della motilità articolare. Inoltre i pazienti riscontravano un aumento delle resistenze fisiche agli sforzi. In generale si può concludere che questa terapia è stata ben tollerata, non si sono presentate reazioni gravi al farmaco, ci sono state solo reazioni di ipersensibilità che si sono ridotte o con la somministrazione di dosi maggiori di antistaminico, o con la riduzione della velocità d'infusione del farmaco. Tali episodi di ipersensibilità che comunque consistevano o in rash cutanei o in lieve ipertermia febbrile sono totalmente scomparsi a partire dalla settimana di trattamento 104. Anche nel caso di questa terapia, i soggetti hanno sviluppato anticorpi di tipo IgG contro l'enzima sostitutivo, però tali titoli anticorpali dopo due anni dall'inizio del trial terapeutico si sono ridotti, comportando una immuno tolleranza nei confronti della Laronidasi. Il grosso limite di questa terapia è che l'enzima ricombinante non riesce a passare

attraverso la barriera emato-encefalica, quindi non ha assolutamente alcun effetto a carico del S.N.C., e se questo fatto per i soggetti affetti dalla forma IS e IHS non rappresenta un problema, è chiaro che i pazienti affetti dalla forma grave di Hurler non possono sperare in una non progressione del danno neurologico sottoponendosi alla ERT e per tale motivo nel loro caso il trattamento da effettuare, lì dove ci fossero le condizioni, è il trapianto di midollo osseo, a cui comunque deve seguire la ERT per le altre manifestazioni della patologia 27.

Visti i dati ottenuti, l'uso della Laronidasi è stato approvato nel 2003 dalla Food and Drug Administration e dalla European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.

Per ciò che concerne la *MPS VI o malattia di Maroteaux-Lamy* gli studi condotti hanno portato alla produzione di N-acetilgalattosamina-4-solfatasi umana ricombinante (rhASB). Anche questo enzima è stato creato grazie alla tecnologia del DNA ricombinante mediante coltivazione in cellule ovariche di criceto cinese geneticamente ingegnerizzate. Gli studi in vitro hanno dimostrato che rhASB viene efficacemente assorbita dai soggetti affetti da MPS VI a mezzo dei fibroblasti coltivati e che una volta assorbito, l'enzima inizia la degradazione del dermatan-solfato entro 92 ore. L'attività farmacologica, farmacocinetica, la biodistribuzione e la sicurezza dell'rhASB sono state valutate in tre specie animali prima che sull'uomo. Tutti gli studi farmacologici non clinici sono stati condotti su gatti affetti da MPS VI (il cui modello sperimentale è simile a quello umano sia dal punto di vista biochimico, che clinico, specie per la patologia scheletrica e dei tessuti molli), i risultati ottenuti sono stati: aumento dei livelli di enzima nei tessuti e riduzione dei GAG urinari e tissutali, a ciò si è associata normalizzazione istopatologica di organi e tessuti. Il trattamento a lungo termine sui modelli animali ha riportato una riduzione dei vacuoli di deposito nelle cellule del Kupffer e nel tessuto connettivo, aumento di volume dei minerali nelle ossa, maggiore mobilità e flessibilità articolare, e in alcuni casi un miglioramento dei sintomi neurologici dovuti alla compressione della colonna vertebrale sul midollo. Come reazioni associate all'infusione del farmaco si è riscontrato solo gonfiore e arrossamento temporanei su muso e zampe. Tali episodi si sono risolti con medicamenti e riduzione della velocità di somministrazione dell'enzima. Una volta accertata l'efficacia e la sicurezza dell'enzima sui modelli in vivo, si è passato alla sperimentazione clinica su soggetti affetti da MPS VI, tali pazienti sono stati randomizzati in doppio cieco in due gruppi per differenti dosi di farmaco: 0.2 e 1 mg/kg una volta alla settimana. Inizialmente erano stati ammessi allo studio 6 pazienti con manifestazioni diverse di progressione della malattia. Una prima analisi fu eseguita dopo 24 somministrazioni di ERT e i dati ottenuti hanno dimostrato che la dose di 1mg/kg veniva ben tollerata e produceva una escrezione urinaria di GAG superiore a quella dei soggetti che ricevevano 0.2 mg/kg di rhASB, con gli stessi profili di sicurezza. Inoltre si è riscontrata anche una maggiore escrezione di dermatan-solfato nei soggetti trattati con dosi più elevate. Dalla 24° settimana in poi tutti i pazienti sono stati trattati con la dose di 1mg/kg di enzima e la successiva valutazione biochimica eseguita alla 96° settimana di infusione riportava una rilevante riduzione nei GAG urinari. A questo bisogna aggiungere che alla 96° settimana di trattamento tutti i pazienti riferivano aumento delle resistenze fisiche agli sforzi, riduzione dell'epatosplenomegalia, miglioramento della respirazione e dell'acutezza visiva. Come eventi avversi alla terapia sono stati segnalati in questo studio: febbre, orticaria, dermatite, tachipnea, extrasistole ventricolare e ipotensione. Tutti e 6 i pazienti arruolati hanno sviluppato anticorpi anti ASB alla 30° settimana di studio, chei sono però diminuiti alla 66° settimana di studio mantenendosi costantemente bassi fino alla fine di esso 28. Una volta completato questo primo studio è stato avviato un secondo studio in aperto per valutare pazienti affetti con un maggior grado di deterioramento clinico e i risultati ottenuti sono stati sovrapponibili a quelli del precedente. Per tale motivo nell'ottobre 2003 è iniziato un ulteriore studio, su pazienti affetti da MPS VI, volto a valutare l'efficacia e la sicurezza a lungo termine del trattamento con rhASB. Tale studio esteso in aperto e multicentrico, multinazionale, ha coinvolto anche il nostro Centro e si è concluso nel marzo 2006 (vedi paragrafo esperienza personale).

Il prodotto finale di questi trials clinici è Naglazyme (nome commerciale di rhASB o galsulfase). Il Naglazyme viene distribuito in flaconi da 5 ml che contengono 1mg/ml di principio attivo. I

soggetti affetti da MPS VI devono essere sottoposti ad infusioni settimanali di enzima, somministrato alla dose di 1mg/kg di peso corporeo, diluito in 250 ml di soluzione fisiologica 0.9% di NaCl.

Di recente acquisizione è la terapia per la *Glicogenosi tipo II o malattia di Pompe tipo adulto*. Il principio attivo utilizzato è la alglucosidasi alfa (nome commerciale Myozyme) che è la forma ricombinante della α -glucosidasi acida umana che come sappiamo è l'enzima carente nella malattia di Pompe. Anche questa ERT rappresenta in atto il gold standard del trattamento a lungo termine di questa patologia. Il dosaggio raccomandato è di 20 mg/kg di peso corporeo una volta ogni due settimane, la procedura di ricostituzione del principio attivo prima dell'infusione è del tutto analoga alle precedenti. Gli studi clinici condotti per circa un anno su pazienti affetti da malattia di Pompe, hanno dimostrato che le eventuali reazioni al farmaco sono: rash cutaneo, aumento della frequenza respiratoria, tosse, agitazione, tremori, aumento della frequenza cardiaca, febbre, vomito, aumento lieve della pressione ed alle volte edema delle palpebre, queste reazioni però sono state documentate solo in 2 dei 39 pazienti sottoposti allo studio.

È in atto un protocollo di studio in pz affetti da malattia di Gaucher, dove viene usata la pet per valutare il grado di distribuzione del farmaco nei pz trattati con ERT, l'obiettivo è eseguire dei protocolli terapeutici e di follow up, adatti ad ogni soggetto. 29

Per concludere aggiungo che sono ancora in fase I gli studi per ERT per MPS IV, ed in fase preclinica quelli per MPS III

CONCLUSIONI

Possiamo concludere dicendo che negli ultimi anni l'interesse delle compagnie farmaceutiche per le malattie lisosomiali è drammaticamente aumentato, tanto da determinare la produzione di differenti strategie terapeutiche, che agiscono in diversi stadi della cascata biochimica della malattia; nonostante ciò non siamo ancora in grado di curare tutte le manifestazioni cliniche di queste patologie, per fare ciò occorreranno ancora molti anni di ricerca e studio.

Possiamo comunque allo stato attuale contare su strategie terapeutiche non più palliative ma anche risolutive di almeno parte dei problemi di alcuni di questi pz, garantendo loro buone prospettive di vita o di qualità della vita.

Ciò offre una speranza non solo ai pazienti come i nostri che sono già vittime di questa invalidità, ma le prospettive sono soprattutto per tutti coloro a cui verrà fatta diagnosi per tempo, senza considerare inoltre che i progressi della medicina, della farmacologia e della genetica molecolare ci porteranno allo sviluppo di terapie geniche che consentiranno la totale mancanza di insorgenza della patologia.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Pavone L, Ruggieri M: Neurologia Pediatrica Masson 2001.
- 2) R.E. Behrman, R.M. Kliegman, A.M. Arvin.: Nelson Trattato di Pediatria XV edizione Minerva Medica 1997.
- 3) Durand P, Sabetta G.: Malattie genetiche McGraw-Hill 1998.
- 4) Baudhin P, Hers HG, Loeb H: An electron microscopic and biochemical study of Type II glycogen. Lab invest 13:1139,1964.
- 5) Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF: The defect in Hurler and Hunter syndromes.II. Deficiency of specific factors involved in mucopolysaccharide degradation. Proc.Natl Acad Sci USA 64:360,1969.

- 6) Olsen I, Dean MF, Muir H, Harris G: Acquisition of beta-glucuronidase activity by deficient fibroblasts during direct contact with lymphoid cells. *J Cell Sci* 55:211,1982.
- 7) Olsen I, Oliver T, Muir H, Smith R, Partridge T: Role of cell adhesion in contact-dependent transfer of a lysosomal enzyme from lymphocytes to fibroblasts. *J Cell Sci* 85:231,1986.
- 8) Di Natale P, Annella T, Daniele A, Negri R, Nitsch L: Cell-to-cell contact between normal fibroblasts and lymphoblasts deficient in lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1138:143,1992.
- 9) Hobbs JR, Hugh-Jones K, Barret AJ, Byrom N, Chambers D, et al.: Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone marrow transplantation. *Lancet* 2: 709,1998.
- 10) Whitley CB, Ramsay NK, Kersey Jh, Krivit W: Bone marrow transplantation for Hurler syndrome: Assessment of metabolic correction. *Birth Defects Orig Article Ser* 22:7,1986.
- 11) Resnick JM, Krivit W, Snover DC, et al.: Pathology of the liver in mucopolysaccharidosis: Light and electron microscopic assessment before and after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 10:273,1992.
- 12) Masterson EL, Murphy PG, O'Meara A, Moore DP, Dowling FE, Fogarty EE: Hip dysplasia in Hurler's syndrome: orthopaedic management after bone marrow transplantation. *J Pediat Orthop* 16:731,1996.
- 13) Gullingsrud EO, Krivit W, Summers CG: Ocular abnormalities in the mucopolysaccharidosis after bone marrow transplantation. Longer follow-up. *Ophthalmology* 105:1099, 1998.
- 14) Li P, Thompson Jn, Hug G, Huffman P, Chuck G: Biochemical and molecular analysis in a patient with severe form of Hunter syndrome after bone marrow transplantation. *Am J Med Genet* 64:531,1996.
- 15) Beck Michael. *Expert opinion emerging drugs* 2010 15 (3): 495- 507
- 16) Fairbairn LJ, Lashford LS, Spooncer E, Mcdermott RH, et al.: Long-term in vitro correction of alpha-L-iduronidase deficiency (Hurler syndrome) in human bone marrow. *Proc.Natl Acad Sci USA* 93:2025,1996.
- 17) Casal ML, Wolfe JH: Amphotropic and ecotropic retroviral vector viruses transduce midgestational murine fetal liver cells in a dual-chambered cocultivation system. *Gene Ther* 4:39, 1997.
- 18) Salvetti A, Moullier P, Cornet V, et al.: In vivo delivery of human alpha-l-iduronidase in mice implanted with neo-organs. *Hum Gene Ther* 6: 1153,1995.
- 19) BE Smid, JMFG Aerts, et al. :pharmacological small molecules for the treatment of lysosomal storage disorders. *Expert Opinion Investig Drugs* 2010 19(11):1367-1379
- 20) Beck M, Andria G,: Commentary. *Acta Paediatrica*, 94:57,2005.
- 21) Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, et al.: Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebroidase from natural and recombinant sources. *Ann Int Med* 122 (1):33-9,1995.
- 22) Boven LA, van Meurs M, Boot RG, et al.: Gaucher's cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol* 122:359-69, 2004.
- 23) Verderase CL, Graham OC, Holder MC, et al.: Gaucher's disease: a pilot study of the symptomatic responses to enzyme replacement therapy. *J Neuroscience Nurs* 25:296-301,1993.
- 24) Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA, et al.: Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 285:2743-9,2001.
- 25) Dehout F, Schwarting A, Beck M, et al.: Effects of enzyme replacement therapy with alphasidase alfa on glomerular filtration rate in patients with Fabry disease: preliminary data. *Acta Paediatr Suppl* 92(443):14-5, 2003.
- 26) Kapmann C, Whybra C, Baehner FA, Beck M.: Enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry cardiomyopathy. *Heart Metab* 18:39-41,2002.

- 27) Miebach E.: Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type I. *Acta Paediatrica*, 94 (Suppl 447):58-60,2005.
- 28) Harmatz P, Kramer WG, Hopwood JJ, Simon J, Butensky E.: Pharmacokinetic profile of recombinant human N-acetylgalactosamine 4- sulphatase enzyme replacement therapy in patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): a phase I/II study. *Acta Paediatrica*, 94(Suppl 447):61-68,2005.
- 29) Christopher P. Phenix et al.: imaging of enzyme replacement therapy using PET. *PNAS* June 15 2010, vol 107, n. 24.