

## **PATOLOGIE EREDITARIE CON COMPROMISSIONE DEL MOVIMENTO**

Le malattie neurodegenerative sono malattie debilitanti e in gran parte incurabili fortemente collegate con l'età. Sono patologie in cui parti del cervello, del midollo spinale, o nervi periferici smettono di funzionare in maniera corretta. Col tempo, questa disfunzione causa la compromissione delle regioni dove questi neuroni sono posti. Ogni sindrome si differenzia, almeno idealmente, in base al problema funzionale che si viene a creare a seconda della localizzazione anatomica del danno. Nella pratica clinica però, queste sindromi si sovrappongono nella loro caratterizzazione, in quanto spesso i pazienti presentano sintomi e segni che fanno riferimento a più di un sistema. Le patologie neurodegenerative, che insorgono in maniera subdola, sono spesso raccolte in categorie determinate in base a diversi fattori. E' possibile una classificazione in base al sistema che colpiscono inizialmente, oppure in funzione all'età della loro comparsa o ancora in base alla loro ereditarietà genetica.

Alcune di queste patologie sono caratterizzate dall'espansione di triplette instabili, determinando così la perdita lenta e progressiva di una o più funzioni del sistema nervoso. Si tratta di malattie sia autosomiche sia legate al cromosoma X, causate da espansione di triplette ripetute presenti in alcuni geni: sono sequenze di DNA costituite da tre nucleotidi che si ripetono numerose volte a livello di uno specifico gene. Negli individui normali le triplette di nucleotidi sono presenti in un numero variabile, ma contenuto entro precisi limiti quantitativi. La più specifica proprietà di queste triplette ripetute consiste nella loro instabilità durante la trasmissione germinale (da genitore a figlio), per cui in alcuni individui si può verificare un'espansione del loro numero. Tale fenomeno determina una situazione che viene definita premutazione, tale per cui qualsiasi ulteriore espansione del numero di triplette può indurre la comparsa di una vera mutazione e quindi di una malattia. Peraltro si è osservato che il passaggio da premutazione a vera mutazione si attua, a seconda dei casi, durante la meiosi femminile o quella maschile. Attraverso le successive generazioni è possibile assistere ad una progressiva espansione del numero di triplette che diviene causa diretta della comparsa della malattia. Un'ulteriore espansione del numero di triplette, che può avvenire nel passaggio da una generazione all'altra, comporta un aggravamento dell'espressione clinica della malattia. Questo si esprime non solamente con un peggioramento del quadro clinico, ma anche con una maggiore precocità di comparsa dei sintomi nell'individuo: al suddetto fenomeno viene dato il nome di anticipazione. In base al tipo di ereditarietà possiamo distinguere le patologie neurodegenerative da amplificazione di triplette in:

- AUTOSOMICHE DOMINANTI:
  - *Atassie spinocerebellari (SCA):* Le atassie dominanti sono un gruppo eterogeneo di malattie neurodegenerative caratterizzate da un'espansione della tripletta CAG nella porzione codificante del gene. Ad oggi sono stati identificati 27 loci e 15 geni e sono indicate con l'acronimo SCA (*spinocerebellar ataxia*) e numerate in ordine progressivo sulla base della cronologia della scoperta dei relativi loci o geni-malattia.
  - *Malattia di Huntington (Corea HD):* La malattia è causata dalla espansione della tripletta CAG nel primo esone del gene IT15, che si trova sul braccio corto del cromosoma 4, il quale codifica per la proteina "huntingtina".
- AUTOSOMICHE RECESSIVE: sono spesso caratterizzate dal coinvolgimento di organi e apparati anche al di fuori del sistema nervoso centrale e sono causate da mutazioni di tipo: mitocondriale; metaboliche; da difetto di riparazione del DNA; da alterato folding e degradazione delle proteine che può determinare una "perdita di funzione" della proteina mutata. L'*Atassia di Friedreich (FRDA)* è la più comune ed è l'atassia recessiva ad esordio precoce più frequente in Europa, dove presenta una prevalenza di 1/50000 e la frequenza del portatore è 1/60. La malattia è causata da una **grande espansione di triplette GAA** nel primo introne del gene FXN, localizzato sul cromosoma 9q13.
- X-LINKED: il difetto è su un gene che si trova sul cromosoma X pertanto i maschi sono preferenzialmente affetti. Un esempio di patologia X-linked con CAG repeats è:
  - *Atrofia muscolare spinale e bulbare (Malattia di Kennedy)* dovuta ad una espansione della tripletta CAG (40-62 ripetizioni) nell'esone 1 del gene del recettore degli androgeni, localizzato sul cromosoma Xq11-12.

**Tabella1. Classificazione delle patologie dovute a ripetizione del trinucleotide CAG.**

SCA1	(CAG) <sub>n</sub>	SCA1 (ataxin 1)	Transcription	6-39	40-82
SCA2	(CAG) <sub>n</sub>	SCA2 (ataxin 2)	RNA metabolism	15-24	32-200
SCA3 (MJD)	(CAG) <sub>n</sub>	SCA3 (ataxin 3)	De-ubiquitylating activity	13-36	61-84
SCA6	(CAG) <sub>n</sub>	CACNA1A (CACNA1 <sub>α</sub> )	P/Q-type α1A calcium channel subunit	4-20	20-29
SCA7	(CAG) <sub>n</sub>	SCA7 (ataxin 7)	Transcription	4-35	37-306
SCA17	(CAG) <sub>n</sub>	SCA17 (TBP)	Transcription	25-42	47-63
DRPLA	(CAG) <sub>n</sub>	DRPLA (atrophin 1)	Transcription	7-34	49-88
SBMA	(CAG) <sub>n</sub>	AR (androgen receptor)	Steroid-hormone receptor	9-36	38-62
HD	(CAG) <sub>n</sub>	HD (huntingtin)	Signalling, transport, transcription	11-34	40-121

## ATASSIE SPINOCEREBELLARI (SCA)

Con il termine “atassia” si indica un gruppo di malattie genetiche caratterizzate da degenerazione delle cellule che compongono il cervelletto, che controlla l'equilibrio e fa sì che i movimenti del corpo siano coordinati. Per questo le atassie spinocerebellari hanno come conseguenza alterazioni nella forza, velocità e destrezza dei movimenti. I segni principali sono l'atassia (andatura barcollante), la dismetria (difficoltà nel controllare l'ampiezza dei movimenti); l'ipotonia (diminuzione del tono muscolare); difficoltà nel parlare e nel fissare lo sguardo. Esistono diverse forme di atassie spinocerebellari (SCA); finora sono state identificate più di 27 forme genetiche di SCA (Tabella 1) di cui:

- # SCA 1-2-3-6-7-17 e la DRPLA (dentato-rubro-pallido-luisiana) sono caratterizzate da espansioni CAG patologiche nei soggetti affetti;
- # SCA8, SCA10 sono associate all'espansione del tri- o pentanucleotide ATTCT nella regione intronica;
- # SCA5, SCA13-14 e SCA27 sono causate da mutazioni puntiformi.

In Italia le forme a maggior frequenza sono SCA1 e SCA2, la SCA3 è estremamente rara, e mostrano una distribuzione regionale distinta: la SCA1 prevale nel nord Italia e la SCA2 nel sud Italia.

**Tabella 1** Classificazione genetica delle SCA dominanti

Malattia	Locus	Mutazioni
SCA1	6p23	Ataxin 1-CAG exp
SCA2	12q24	Ataxin 2-CAG exp
SCA3	14q24.3-q31	Ataxin 3-CAG exp
SCA4	16q22.1	Puratrophin, point mutation
SCA5	11p11-q11	Spectrin, point mutation
SCA6	19p13	CACNA1A-CAG exp
SCA7	3p21.1-p12	Ataxin 7-CAG exp
SCA8	13q21	CTG exp (3' UTR)
SCA9	Not assigned	—
SCA10	22q13	Ataxin 10-ATTCT repeat (intronica)
SCA11	15q14-q21.3	?
SCA12	5q31-q33	PPP2R2B-CAG exp (5' UTR)
SCA13	19q13.3-q13.4	KCN4C
SCA14	19q13.4-qter	Protein gamma kinase C
SCA15	3p24.2-pter	?
SCA16	8q22.1-q24.1	?
SCA17	6q27	TBP-CAG exp
SCA18	7q22-q32	?
SCA19	1p21-q21	?
SCA20	11p13-q11	?
SCA21	7p21.3-p15.1	?
SCA22	1p21-q23	?
SCA23	20p13-12.3	?
SCA24	Reserved	-
SCA25	2p15-21	?
SCA26	19p13.3	?
SCA27-FGF14	13q34	FGF14-missense mutations
SCA28	18p11-q2.1	?
DRPLA	12p13.31	Atrophin 1- CAG exp

Dal punto di vista clinico le diverse forme sono piuttosto simili, tanto che spesso non è facile distinguerle solo su base clinica, la distinzione fra le varie forme di SCA è possibile su **base genetica**. Infatti, ognuna di esse è causata dall'alterazione di un diverso gene:

- **SCA 1:** La malattia compare solitamente tra i 30 ed i 40 anni ma spesso si presenta anche nei bambini. La maggior parte dei pazienti, inizialmente, presenta difficoltà nella deambulazione o più frequentemente disturbi relativi all'articolazione delle parole. I pazienti possono mostrare riflessi tendinei improvvisi, episodi di disfagia moderata evidenziati da tosse in seguito all'assunzione di cibo. Con il progredire della malattia si può arrivare anche a paralisi. Si possono riscontrare aumenti dei riflessi, controsenso dell'atassia, ed altri segni cerebellari come dismetria, ed ipotonia. Inoltre si riscontra un declino nell'intelligenza e nella memoria: il grado di queste alterazioni è correlato alla gravità della malattia. Nelle fasi finali sono evidenti difficoltà bulbari (atrofia facciale e dei muscoli della masticazione, fascicolazioni periorali e grave disfagia che porta frequentemente ad aspirazione); alcuni pazienti sviluppano difficoltà respiratorie che li portano spesso alla morte.

*Genetica molecolare:* SCA1 è dovuta all'espansione di una tripletta CAG che, nei soggetti sani va da 6 a 44 ripetizioni, mentre nei pazienti affetti spazia tra 39 e 81 repeats. La frequenza di SCA1 è 1-2:100.000.

- **SCA 2:** Si manifesta verso i 40 anni e la durata è di 10-15 anni. I sintomi precoci includono atassia dell'andatura accompagnata da crampi agli arti inferiori; la maggior parte dei pazienti presenta tremori, diminuzione del tono muscolare e dei riflessi tendinei nonché anormali movimenti oculari. Sono segnalati anche casi di fascicolazioni (23%) e demenza (33%).

*Genetica molecolare:* SCA2 è dovuta ad un'anormale espansione della tripletta CAG nel gene ATXN2 (12q24). Le triplette CAG sono normalmente 14-34 copie negli alleli sani e possono aumentare da 36 a 64 nell'allele patologico.

- **SCA 3:** E' stata descritta per prima volta tra gli immigrati dell'isola portoghese delle Azzorre ed è caratterizzata da atassia cerebellare, distonia, sindrome da Parkinsonismo, amiotrofia periferica. La malattia progredisce fino alla morte che avviene 6-29 anni dopo l'esordio della malattia, in seguito a complicazioni polmonari e cachessia.

*Genetica molecolare:* SCA3 è dovuta all'espansione della tripletta CAG nel gene ATXN3 sul cromosoma 14q32. Il range normale della ripetizione è compreso tra 12 e 38, mentre quello patologico è tra 56 e 86.

- **SCA 6:** E' caratterizzata da progressiva atassia cerebellare, disartria, nistagmo, instabilità di andatura, incoordinazione degli arti superiori, tremore, disfagia e soffocamento, disturbi visivi con diplopia ( 50%), difficoltà di fissare oggetti in movimento, nistagmo (70 % -100%). La malattia progredisce lentamente e l'aspettativa di vita non è diminuita. L'età media di insorgenza è 43-52

anni, e il quadro clinico varia anche all'interno della stessa famiglia. La prevalenza è variabile: elevata in Giappone e moderata in Europa.

*Genetica molecolare:* SCA6 è caratterizzata da un'espansione della tripletta CAG nel gene CACNA1A sul cromosoma 19p13, che codifica la subunità alfa1 del canale neuronale del calcio tipo P/Q a voltaggio dipendente (VGCC). Gli individui affetti presentano un numero dei repeat CAG compreso tra 21 e 30 e una progressiva perdita neuronale, per alterato rilascio di neurotrasmettitori o per incremento di  $Ca^{2+}$  intracellulare.

- **SCA 7:** È caratterizzata da atassia cerebellare progressiva e comprende disartria, disfagia, distrofia della retina e dei coni con progressiva perdita della visione centrale che determina cecità negli affetti adulti. Il fenotipo varia da esordio nell'infanzia con un corso accelerato e morte precoce; fino ad un esordio nel quinto o sesto decennio con degenerazione lenta e progressiva e atassia cerebellare.

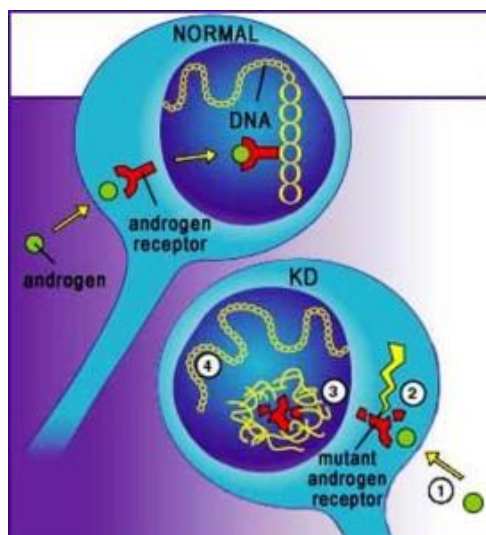
*Genetica molecolare:* È causata da una espansione CAG nel gene ATXN7 localizzato sul cromosoma 3p12-13. La sua funzione è sconosciuta sebbene alcune evidenze indichino che può avere una localizzazione nucleare e che quindi potrebbe funzionare come fattore trascrizionale. Gli alleli normali hanno tra 4-19 ripetizioni, mentre gli alleli patologici hanno da 37 a 460 ripetizioni.

## ATROFIA MUSCOLARE SPINO-BULBARE (MALATTIA DI KENNEDY)

La malattia di Kennedy, nota anche come atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA), è una malattia rara dei motoneuroni, trasmessa con modalità recessiva legata all'X, caratterizzata da atrofia dei muscoli bulbari e prossimali; la prevalenza della SBMA è di 1/30.000 nati maschi ed ha esordio tra i 30 e i 60 anni.

I segni clinici iniziali comprendono il tremore, i crampi muscolari, l'affaticamento e la disartria, man mano che la malattia progredisce, i pazienti sviluppano anche debolezza e atrofia dei muscoli bulbari e degli arti, manifestando disartria, disfonia, tic muscolari, atrofia linguale, difficoltà alla masticazione e anomalie del movimento, il declino cognitivo è minimo o assente. Negli stadi terminali della malattia, alcuni pazienti possono avere problemi alla deglutizione o alla respirazione. I segni non neurologici comprendono la ginecomastia, l'ipogonadismo (causa di sterilità e impotenza) e, in rari casi, l'ernia inguinale.

La SBMA è dovuta a un'espansione instabile della tripletta CAG ripetuta (40-62 ripetizioni) nell'esone 1 del gene del recettore degli androgeni (AR) sul cromosoma Xq11-12. L'aumento anomalo delle ripetizioni della tripletta CAG causa l'allungamento della sequenza delle glutamine all'interno del recettore degli androgeni. L'espansione della sequenza poliglutaminica provoca alterazioni della ripiegatura e proteolisi dell'AR mutato, rendendolo insensibile agli ormoni androgeni. Nel nucleo dell'AR si producono dei frammenti che si aggregano; si ritiene che questi aggregati causino disregolazione della trascrizione di diverse altre proteine e, di conseguenza, siano responsabili della neurogenerazione dei motoneuroni. In assenza di un numero sufficiente di motoneuroni, non è più possibile la contrattura muscolare, con conseguente evoluzione verso l'atrofia muscolare progressiva. La progressione della malattia è lenta, solo un terzo dei pazienti ricorre alla sedia a rotelle 20 anni dopo la diagnosi. La prognosi è di solito buona e l'attesa di vita è lievemente ridotta.



## **ATASSIA DI FRIEDREICH**

L'ataxia di Friedreich (FRDA) è la più comune atassia recessiva con prevalenza 1:50.000 nelle popolazioni Caucasiche e una frequenza del portatore di 1:60. I soggetti affetti da FRDA presentano un'importante e precoce perdita dei neuroni sensitivi primari nei gangli delle radici dorsali, atrofia dei cordoni posteriori e dei tratti spinocerebellari e in minor misura dei tratti piramidali del midollo spinale. Si tratta di una malattia dei sistemi sensitivi afferenti al cervello e al cervelletto, indispensabili per il controllo del movimento.

Clinicamente l'ataxia di Friedreich è caratterizzata da atassia lentamente progressiva con esordio precoce tra i 10 e 15 anni e di solito prima dei 25 anni. FRDA è tipicamente associata con disartria, debolezza muscolare, spasticità degli arti inferiori, scoliosi, disfunzioni della vescica, assenza dei riflessi degli arti inferiori, e la perdita della posizione e del senso di vibrazione. Circa due terzi delle persone con FRDA hanno cardiomiopatia che tende ad evolvere verso una cardiomiopatia dilatativa con aritmie gravi e scompenso, che sono la più frequente causa di morte; fino al 30% hanno il diabete mellito; e circa il 25% ha una presentazione "atipica" con insorgenza tardiva (dopo i 25 anni) e riflessi tendinei conservati.

Dopo circa 10 anni di malattia i pazienti con forma classica sono costretti alla sedia a rotelle; la vita media è moderatamente ridotta nella forma medio-grave; una frazione dei pazienti muore a meno dei 20 anni per complicanze cardiologiche.

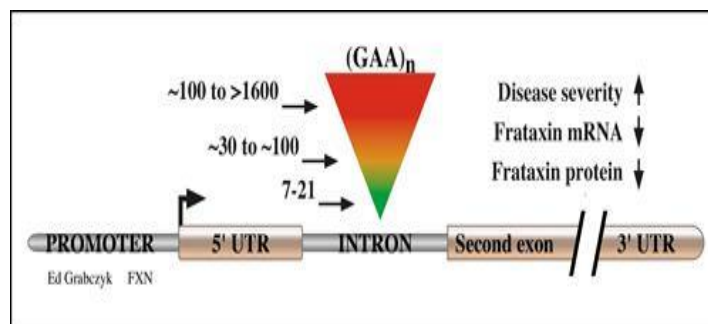
**Genetica molecolare** - La malattia è causata da una grande espansione di tripletta GAA ripetute nel primo introne del gene FXN, localizzato sul cromosoma 9q13, il quale codifica per una proteina mitocondriale di 210 amminoacidi denominata fratassina, la cui espressione è marcatamente ridotta a causa dell'effetto negativo dell'espansione GAA sulla trascrizione. Il soggetti normali hanno un numero di GAA compreso tra 6 e 36, mentre i soggetti affetti hanno alleli con ripetizioni di 66 - 1700 triplette. Circa il 96% degli individui con FRA sono omozigoti per l'espansione della tripletta GAA nel 1° introne del gene FXN. Circa il 4% degli individui con FRDA sono eterozigoti composti con espansione GAA: presentano un allele FXN con espansione e una mutazione puntiforme inattivante FXN o una microdelezione sull'altro allele.

Sulla base del numero di triplette GAA nell'introne 1 del gene FXN possiamo riconoscere 4 classi di alleli:

- Alleli normali con ripetizioni GAA comprese tra 5 e 33. Più dell'80% degli alleli contiene meno di 12 GAA, circa il 15% ha 12- 33 ripetizioni GAA, raramente alleli normali contengono più di 27 GAA.



- Alleli normali con premutazione con ripetizioni 34- 65 GAA ininterrotte. Questi non sono associati con lo stato di malattia ma possono espandere durante la trasmissione parentale e risultare alleli che causano la malattia alla generazione successiva. È stato visto che alleli con più di 27 ripetizioni GAA sono spesso interrotte da sequenze  $(GAGGAA)_n$  o anche  $(GAAAGAA)_n$  che sembrano stabilizzare gli alleli premutati e prevenire la loro espansione.
- Alleli espansi con penetranza completa con 66-1700 ripetizioni GAA; la maggioranza degli alleli espansi contiene tra 600 e 1200 GAA.
- Alleli borderline con 44- 66 ripetizioni GAA, l'esatta demarcazione tra alleli normali e alleli a penetranza completa non è stata determinata, finora l'allele più corto associato a FRDA è stato con 44 triplette GAA ininterrotte.



I dati molecolari fanno ritenere che l'espansione della tripletta GAA determini la formazione di strutture secondarie di DNA che interferiscono con la trascrizione: l'effetto della mutazione intronica determina una ridotta sintesi di frataxina che è direttamente proporzionale alla lunghezza delle triplette ripetute e determina una "perdita di funzione". La frataxina è una piccola proteina mitocondriale di matrice a funzione non ancora nota, nel corso degli ultimi anni si è ipotizzato che possa svolgere un ruolo:

- a- nell'immagazzinamento del ferro intra-mitocondriale in forma non tossica;
- b- attività antiossidante;
- c- attivazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale (OX-PHOS);
- d- nella biosintesi dei complessi ferro- zolfo (Fe- S).

Appare probabile che la frataxina contribuisca significativamente alla produzione di energia nei mitocondri e ad altre importanti funzioni cellulari, anche extramitocondriale, fornendo il ferro (Fe) necessario per la biosintesi dell'eme e dei complessi Fe-S. La mancanza della proteina causerebbe un deficit secondario degli enzimi e delle proteine che necessitano, per la loro funzione, dell'eme (es.

citocromo C o complesso 4 della catena respiratoria) o dei complessi Fe-S (es. complessi della catena respiratoria). La ridotta sintesi di queste molecole causerebbe un minor utilizzo del ferro disponibile che si accumulerebbe in forma tossica nei mitocondri, con conseguente danno ossidativo dei lipidi di membrana e delle proteine coinvolte nella respirazione mitocondriale. Questa ipotesi patogenetica ha suggerito diversi approcci terapeutici con antiossidanti, in primo luogo l'idebenone, farmaco usato nel trattamento della cardiopatia nella FRDA o con chelanti del ferro. L'identificazione e la caratterizzazione molecolare dei pazienti FRDA è particolarmente importante, specifici trattamenti possono ritardare la progressione della malattia. Il trattamento dei soggetti presintomatici in famiglie caratterizzate potrebbe persino prevenire l'insorgenza dei sintomi clinici.

**Terapia** - Al momento non esiste una cura, l'obiettivo principale del trattamento consiste nel:

- Mantenimento delle capacità residue,
- Miglioramento di alcune funzioni motorie,
- Mantenimento delle capacità relazionale,
- Miglioramento della qualità della vita.

Individui FRDA mostrano un aumento dello stress ossidativo, perciò le due possibilità terapeutiche sono:

- Rimozione dell'eccesso di ferro dai mitocondri,
- Utilizzo di farmaci antiossidanti, che sono meno tossici e ben tolleranti.

I farmaci antiossidanti come la N-acetil-cisteina, aiutano a prevenire la morte programmata delle cellule e aumentano l'attività della catena respiratoria in vitro. L'associazione di Coenzima Q10 e vitamina E ha portato a migliorare il rapporto fosfocreatinina/ ATP nel cuore ed ad incrementare la produzione di ATP nel muscolo scheletrico, senza modifiche del quadro neurologico ed ecocardiografico. La somministrazione di idebenone ha ridotto l'ipertrofia cardiaca del 20% nel 50% dei casi FRDA.

## COREA DI HUNTINGTON

La malattia di Huntington (*Huntington's disease*, HD) è un disturbo neurodegenerativo progressivo con eredità autosomica dominante che si manifesta con disturbi psichiatrici, motori e cognitivi; l'età di insorgenza varia dai 35 ai 55 anni con sopravvivenza media intorno ai 15-18 anni dopo la comparsa dei primi sintomi. Entrambi i sessi possono essere colpiti indistintamente con la stessa frequenza.

La malattia è causata da una mutazione in una delle due copie (alleli) del gene IT-15, localizzato sul braccio corto del cromosoma 4 sul *locus* 4p16.3. Questo gene contiene le informazioni per la produzione di una proteina che è stata chiamata *huntingtina*. Il gene huntingtina è formato da 67 esoni e all'interno del primo esone è presente una "tripletta" di 3 basi nucleotidiche (CAG) che codificano per la glutammina. I soggetti normali possiedono fino a circa 30 ripetizioni del codone CAG, mentre quelli patologici superano le 36 ripetizioni fino a più di un centinaio; le persone con un numero intermedio di triplette, tra le 27 e le 35, non sviluppano la malattia ma rischiano di tramandarla ai figli, attraverso un meccanismo di amplificazione: può verificarsi infatti, durante la gametogenesi, un'ulteriore espansione della tripletta che può determinare la manifestazione patologica della malattia nella prole.

Questa tendenza interessa principalmente la spermatogenesi, per cui la trasmissione della pre-mutazione avviene nella maggior parte dei casi per via paterna.

La proteina huntingtina, che in forma normale ha funzione neuroprotettiva, se mutata acquisisce una funzione tossica responsabile della morte graduale dei neuroni.

La malattia non è curabile, la terapia è esclusivamente sintomatica; nel corso della malattia i sintomi diventano sempre più debilitanti a tal punto che l'assistenza a tempo pieno del malato diventa indispensabile nelle fasi più avanzate.

La prevalenza mondiale dell'HD è stimata intorno ai 5-10 casi ogni 100.000 persone, con forti variazioni geografiche: un picco elevato si registra nella regione del lago di Maracaibo in Venezuela. Inoltre è particolarmente diffusa nelle popolazioni europee occidentali, mentre Giappone, Cina ed altri paesi asiatici sono colpiti in maniera minore. Queste discrepanze sono frutto delle differenze genetiche tra i vari gruppi etnici in termini di diversi aplotipi e di lunghezza del tratto CAG.

**DIAGNOSI CLINICA** - Età di insorgenza, sintomi e progressione della malattia possono variare in maniera significativa tra un soggetto e l'altro, anche all'interno della stessa famiglia. La patologia si manifesta generalmente intorno ai 35-55 anni con la comparsa dei primi sintomi, portando progressivamente l'individuo all'invalidità totale e successivamente alla morte nel giro di 15-20 anni.

I sintomi caratteristici appaiono gradualmente con l'avanzare della malattia e possono essere raggruppati in una triade caratteristica, suddivisa in:

- *Sintomi motori*: movimenti coreici (andatura danzante), spasmi muscolari, scatti involontari degli arti, perdita di coordinazione, difficoltà di deglutizione, disfagia, rapida perdita di peso e anoressia;
- *Sintomi cognitivi*: deficit di attenzione e concentrazione, riduzione della memoria a breve termine, demenza, disturbi del sonno, difficoltà di parola e disartria;
- *Sintomi psichiatrici*: alterazioni della personalità, irritabilità, impulsività, aggressività, ansia, depressione, isolamento sociale, apatia, psicosi.

I segni clinici più evidenti sono riscontrabili in tre diverse fasi della malattia, anche se l'insorgenza varia da soggetto a soggetto:

- Fase iniziale: riduzione delle performance intellettive, alterazioni comportamentali, stress emotivo e altri disturbi cognitivi possono precedere di mesi o addirittura di anni la comparsa dei sintomi motori, quali movimenti involontari oculari e degli arti, smorfie facciali, iperflessia; per questo l'esordio della malattia non è spesso facilmente riconoscibile;
- Fase intermedia: quadro clinico caratterizzato da corea, rigidità muscolare e bradicinesia che pregiudicano l'attività motoria volontaria, compromissione del linguaggio (disartria) accompagnato da difficoltà nel deglutire (disfagia), aggravarsi dei deficit cognitivi con incapacità di svolgere attività lavorative e di adempiere ai compiti domestici;
- Fase avanzata: rallentamento movimenti e distonia, difficoltà di deambulazione, difficoltà nella capacità di alimentarsi che contribuisce alla perdita di peso, perdita di indipendenza richiede assistenza totale; la morte subentra in seguito a complicazioni cardiache e polmonari della malattia, come infezioni, soffocamento o pneumonia, oppure suicidio.

La diagnosi clinica della malattia, basata sul riscontro e l'osservazione di questi peculiari disturbi motori e psichiatrici, deve essere confermata dalla diagnosi molecolare per determinare l'esatto numero di CAG ripetuti nel gene IT-15.

**BASI MOLECOLARI DELLA COREA DI HUNTINGTON** - La mutazione responsabile della malattia è caratterizzata dall'espansione della sequenza trinucleotidica CAG nel primo esone del gene IT-15. Il gene IT-15 produce una proteina di 3144 aminoacidi di grosse dimensioni (peso molecolare di 350 kDa), denominata *huntingtina*, ubiquitariamente ed ampiamente espressa, con localizzazione sia nucleare che citoplasmatica. La sua funzione non è ancora del tutto chiara, sebbene sia stata dimostrata l'importanza del suo ruolo nel traffico e nel trasporto molecolare intracellulare, nell'endocitosi, nell'inibizione di processi apoptotici, nonché in attività protettive e

‘salvavita’ per le cellule cerebrali (l’huntingtina in forma normale regola la sintesi di BDNF, un fattore vitale per i neuroni dello striato).

Si ipotizza che l’espansione delle triplette CAG nel primo esone del gene, conduca all’acquisizione da parte della proteina di una funzione tossica responsabile di: danno ossidativo, degenerazione cellulare, mancata regolazione del processo di trascrizione, disfunzioni del trasporto inter-neurale, interferenza con omeostasi e segnalazione cellulare del calcio, alterazioni mitocondriali, disfunzioni del metabolismo energetico e una serie di difetti che compromettono numerosi processi vitali delle cellule nervose. La presunta tossicità è spiegata dalla presenza del tratto di poliglutammine che ne modifica la conformazione proteica, rendendola più suscettibile a taglio proteolitico, inducendo interazioni anomale con altre proteine e variandone la normale localizzazione.

La perdita di funzionalità dell’huntingtina normale produce gravi danni cerebrali. La malattia di Huntington si manifesta infatti con una degenerazione neuronale irreversibile che porta a una grave atrofia a livello dei gangli della base nel corpo striato (nucleo caudato e putamen). Con il progredire della malattia, il danno si espande alle cellule della corteccia cerebrale ed eventualmente dell’ipotalamo. La morte di queste cellule è causata quindi dall’accumulo intracellulare di huntingtina mutata tossica, ma allo stesso tempo anche da una perdita o deficit della funzione neuroprotettiva dell’huntingtina normale.

Esistono inoltre persone con ‘alleli intermedi’ che hanno ripetizioni CAG comprese tra 27 e 35 CAG. Le persone con un allele intermedio non svilupperanno la HD, ma può esserci un rischio che si sviluppi la malattia nei loro figli. Il numero di ripetizioni CAG può essere instabile quando il gene viene trasmesso alla generazione successiva. Ciò significa che il numero di ripetizioni CAG può aumentare quando il gene è passato da genitore a figlio.

Le variazioni nella lunghezza delle ripetizioni sono chiamate ‘espansioni’ quando alla generazione successiva vengono passate più ripetizioni CAG.

Sebbene le persone con alleli intermedi (27-35 ripetizioni) non manifesteranno mai i sintomi della HD, le ripetizioni ereditate dai loro figli potrebbero essere in numero maggiore rispetto a quelle del genitore. Pertanto i figli di persone portatori di alleli intermedi sono a rischio di ereditare il gene malattia a penetranza ridotta o a penetranza completa.

### **Il RANGE DELLE RIPETIZIONI CAG permette di classificare:**

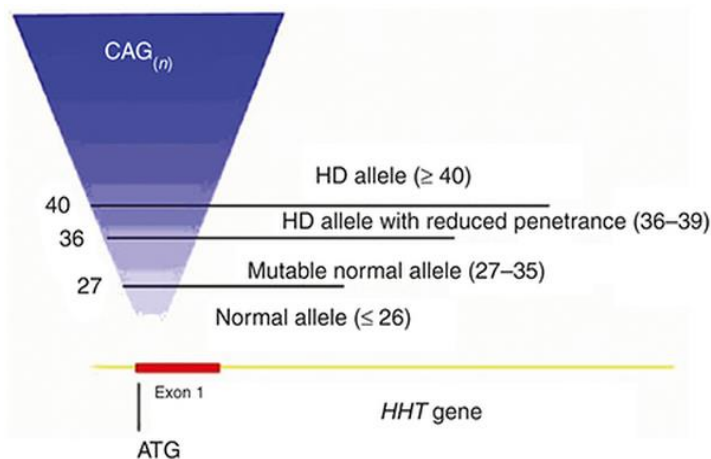
- **Alleli normali:** sono definiti alleli normali quelli con meno di 27 ripetizioni CAG; questi non sono patologici e segregano durante la meiosi in maniera stabile. **GLI INDIVIDUI SONO SANI**
- **Alleli intermedi (IA):** sono alleli intermedi quelli contenenti tra 27 e 35 ripetizioni CAG. Questi rientrano nel range di normalità ma hanno tendenza all’instabilità

**meiotica, per questo sono definiti MUTABILI.** Un soggetto portatore di un'espansione del tratto di CAG di lunghezza intermedia, tra le 27 e le 35 ripetizioni, manifesta un fenotipo normale non associato alla malattia. Tuttavia, è elevato il rischio che queste persone trasmettano la MALATTIA ai figli. Ciò accade perché durante la fase di gametogenesi, nello sviluppo embrionale, può verificarsi un'ulteriore aumento del numero di CAG poiché questa regione è particolarmente instabile con conseguente comparsa della malattia nella prole.

L'espansione del numero delle triplette nel corso delle generazioni è responsabile del fenomeno dell'**anticipazione**, caratteristica peculiare e comune a tutte le patologie causate da instabilità genica. Il fenomeno dell'anticipazione significa che passando da una generazione all'altra può avvenire un aumento progressivo delle ripetizioni CAG, con conseguente manifestazione della patologia nelle generazioni successive sempre più precoce rispetto ai genitori.

- **Gli individui che possiedono un gene HD contenente 36-39 ripetizioni CAG sono MALATI ma rientrano nello spettro della 'penetranza ridotta'** cioè sono associati a fenotipo patologico con insorgenza molto tardiva (anche dopo i 60-70 anni);
- **Alleli con un numero di ripetizioni superiore a 40 CAG sono mutati e mostrano penetranza completa**, cioè la malattia si manifesta sicuramente in tutti i suoi segni clinici. Inoltre bisogna ricordare che tanto maggiore è il numero di CAG tanto più precocemente la malattia si manifesta: superate le 55-60 ripetizioni, l'esordio dei primi sintomi può avvenire anche prima dei 20 anni.

La Figura 4.1 mostra la distribuzione delle ripetizioni CAG.



**Fig. 4.1. – Diagramma del gene IT-15 che rappresenta i polimorfismi del tratto CAG nel primo esone**

TERAPIA- Il trattamento delle manifestazioni prevede una terapia farmacologica sintomatica di supporto con la somministrazione di ansiolitici e sedativi (*tetrabenazina* per il trattamento dei disordini coreici del movimento, *neurolettici atipici* contro allucinazioni e psicosi, *antidepressivi*, *antiparkinsoniani*). Attualmente non esiste alcun rimedio terapeutico soddisfacente in grado di modificare od ostacolare il decorso della malattia.

Da qui la necessità di sviluppare, attraverso la ricerca di nuovi targets molecolari, terapie innovative precoci, efficaci e risolutive nei confronti della malattia, sia in termini di trattamenti neuroprotettivi che di cure sintomatiche; risulta fondamentale quindi comprendere come le disfunzioni che portano alla morte delle cellule nervose nei pazienti siano tra loro correlate e quali equilibri cellulari vengano modificati dalla presenza della mutazione.

## LE DISTONIE

Le distonie sono un gruppo di patologie classificabili tra i disordini del movimento, caratterizzate da contrazioni muscolari involontarie prolungate che causano frequentemente torsioni, movimenti ripetitivi o posture anomale. La distonia rappresenta il terzo più comune disordine del movimento, dopo Parkinson e Alzheimer, e comprende un'ampia gamma di differenti sindromi cliniche (Geyer et al. 2006). E' caratterizzata da alterazioni nel controllo del movimento con forti spasmi e contrazioni muscolari involontarie accompagnati in alcuni casi anche da forti dolori. Possono essere colpiti singoli muscoli (es. palpebre), gruppi muscolari più ampi come quelli degli arti inferiori e superiori, o l'intero organismo. Muscoli oppositori si contraggono involontariamente e simultaneamente creando una sorta di "competizione" per il controllo delle varie parti del corpo. Queste contrazioni muscolari inducono movimenti ripetitivi di torsione e posture del tutto innaturali. Nei casi più gravi di distonia il soggetto diviene del tutto impossibilitato alla deambulazione o a mantenere una corretta stazione eretta. Ai casi di distonia non sono associati fenomeni evidenti di ritardo mentale o di disordini psichici, anche se limitati casi di depressione sono stati descritti. Le sindromi distoniche sono molto eterogenee e comprendono una grande varietà di malattie.

**GENETICA DELLE DISTONIE** - L'ipotesi che alcune forme di distonia siano ereditarie risale a molti decenni orsono. Tuttavia soltanto nel 1990 è stato possibile localizzare per la prima volta un gene correlato alla distonia. Attualmente sono stati individuati differenti loci genici correlati a forme di distonia fenotipicamente distinte. La distonia ereditaria può essere classificata attraverso le modalità di trasmissione, e dai geni o dalla posizione dei loci. Ad oggi la causa genetica è stata inequivocabilmente identificata per 10 forme ereditarie di distonia primaria.

Di queste, otto sono autosomico dominante e comprendono DYT1, DYT5a, DYT6, DYT8, DYT11, DYT12 DYT18 e DYT24; una autosomica recessiva e comprende DYT5b; una è X-linked recessiva, DYT3.

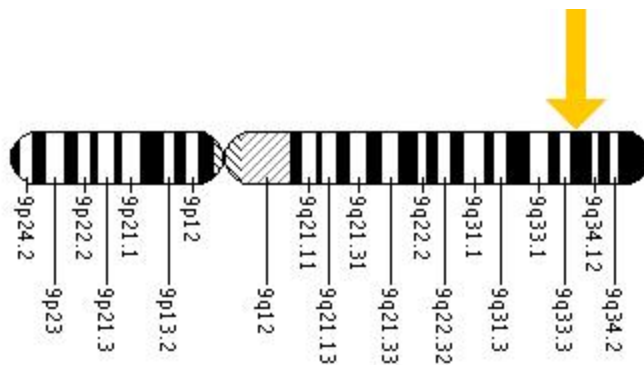
Inizialmente queste malattie **MONOGENICHE** sono state designate DYT seguito da un numero, che rappresenta l'ordine cronologico della descrizione del fenotipo e/o la prima apparizione nella letteratura della loro scoperta. Anche se alcune delle distonie ereditate hanno un distinto fenotipo, esiste una considerevole sovrapposizione fenotipica che rende la classificazione problematica.

**La distonia PRIMARIA DYT1** è una grave forma ereditaria, autosomica dominante di distonia generalizzata che insorge nell'infanzia o nell'adolescenza, e solo occasionalmente nell'età adulta, in un arco di tempo che va tipicamente dai 5 ai 28 anni di età. Nei casi più precoci, i sintomi si manifestano a partire dagli arti inferiori per poi espandersi alla parte superiore del corpo. In particolare, i sintomi iniziali sono i cambi nell'andatura corporea, il disallineamento nella postura dei piedi (torsione verso l'interno o verso l'esterno) o problemi nella capacità di scrivere. Nei casi più



tardivi la sintomatologia rimane localizzata principalmente alla metà superiore del corpo. Mancano altri disturbi neurologici, eccetto il tremore posturale del braccio. La gravità della malattia varia considerevolmente anche all'interno della stessa famiglia.

Soltanto nel 1990 Ozelius e coll. negli USA (Ozelius LJ, et al. 1992) sono stati in grado di identificare per la prima volta un gene correlato alla distonia – il gene DYT1 sul braccio lungo del cromosoma 9q34, utilizzando l'analisi di linkage (Figura 1).



**Figura 1.** Localizzazione cromosomica del gene TOR1A sul braccio lungo del cromosoma 9 in posizione q34.

Qualche anno più tardi la stessa équipe identificava la mutazione responsabile della malattia: una mutazione per delezione di 3 paia di basi riscontrata in tutti i pazienti in cui il locus responsabile era stato mappato sul cromosoma 9q.

Il gene DYT1-TOR1A codifica la proteina torsin-1A (torsinA) ed è formato da cinque esoni. È l'unico gene noto associato con la distonia primaria a insorgenza precoce (DYT1). La maggioranza degli individui affetti ha la delezione c.904\_906delGAG, che è responsabile di circa il 60% dei casi tipici.

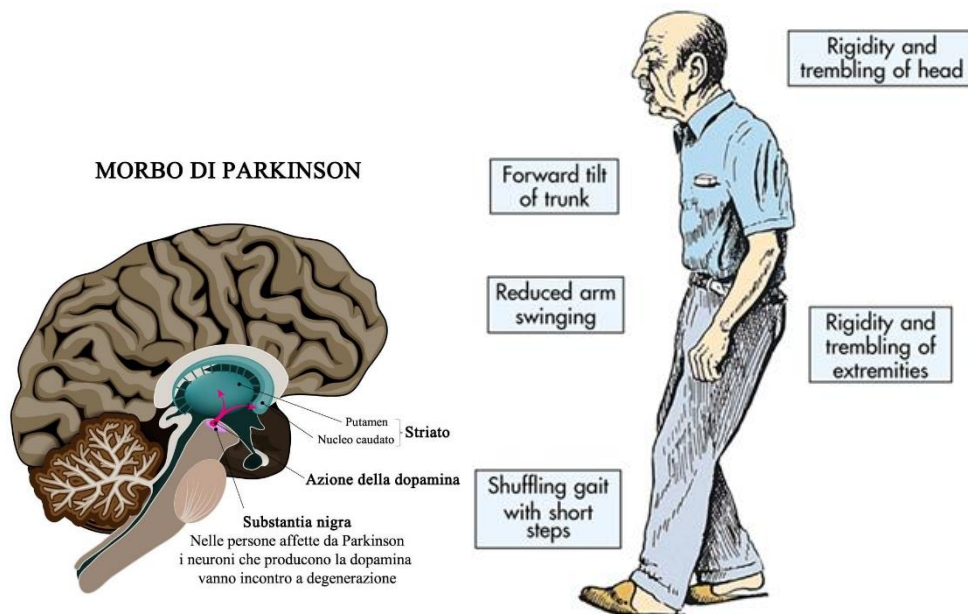
**Terapia** -La terapia ha lo scopo di alleviare i sintomi. Di solito sono utilizzati farmaci come ad esempio:

- 1) anticolinergici come **triexifenidil** (moderatamente efficaci per il 40% -50% degli individui)
- 2) **baclofen** (Lioresal)
- 3) le **benzodiazepine** (lorazepam), in particolare **clonazepam**
- 4) altri farmaci provati da soli o in combinazione con le categorie precedenti: **levodopa**, **carbamazepina**, e gli agenti che riducono la dopamina (reserpina, tetrabenzine)
- 5) iniezioni di tossina botulinica direttamente nei muscoli distonici sono generalmente il trattamento scelto per distonie focali ad insorgenza nell'età adulta. Per gli individui con distonia più diffuse, nei quali i gruppi muscolari specifici producono sintomi invalidanti, tali iniezioni possono essere utili, e sono spesso usate in combinazione con farmaci per via orale.

Se i farmaci falliscono si propone un intervento chirurgico per **consentire la stimolazione cerebrale profonda (DBS) del globo parietale interno(GPI)** che ha dimostrato essere un trattamento efficace per la distonia primaria generalizzata e anche per individui con distonia DYT1 ad esordio precoce. La DBS può portare raramente a complicazioni acute (emorragia) e croniche (infezione concomitante, frattura). L'intervento potrebbe essere proposto nella fase iniziale della malattia per limitare le conseguenze funzionali (complicazioni ortopediche) e migliorare la prognosi e il recupero funzionale.

## Malattia di PARKINSON

Si tratta di un disturbo del sistema nervoso centrale caratterizzato principalmente da degenerazione di alcune cellule nervose (neuroni) situate in una zona profonda del cervello denominata sostanza nera. Queste cellule producono un neurotrasmettitore, la dopamina, responsabile del controllo del movimento. Con la riduzione di almeno il 50% dei neuroni dopaminergici viene a mancare un'adeguata stimolazione dei corrispondenti recettori che sono situati nello striato. I neuroni dopaminergici della sostanza nera, sofferenti, osservati al microscopio, mostrano al loro interno corpuscoli sferici denominati corpi di Lewy composti prevalentemente da  $\alpha$ -SINUCLEINA, che sono considerati una caratteristica specifica della malattia di Parkinson e che fa rientrare questa malattia nel più ampio gruppo delle "sinucleinopatie". Queste si differenziano a seconda delle zone interessate dai corpi di Lewy e possono variare da un esteso interessamento della corteccia (demenza), un interessamento specifico di sostanza nera e locus ceruleus (malattia di Parkinson) o di sistemi nervosi che innervano i visceri (atrofia multisistemica con compromissione del sistema nervoso autonomo).



### Regioni colpite e sintomi principali della Malattia di Parkinson

Eziologia - La maggior parte delle persone con malattia di Parkinson presenta una condizione idiopatica (che non ha una causa specifica nota). Una piccola percentuale di casi, tuttavia, può essere attribuita a fattori genetici conosciuti. Altri fattori sono stati associati con il rischio di sviluppare la malattia, ma non sono state dimostrate relazioni causali.

La malattia di Parkinson è stata tradizionalmente considerata una malattia non genetica. Tuttavia, circa il 15% degli individui con malattia di Parkinson ha un parente di primo grado con la stessa condizione. Almeno il 5% delle persone è ormai noto per avere forme della malattia che si verifica a causa di una mutazione di uno dei numerosi geni specifici.

È stato dimostrato in modo definitivo che le mutazioni in geni specifici possono essere causa della malattia. Questi geni codificano per alfa-sinucleina (SNCA), parkina (PRKN), dardarina (LRRK2), PTEN chinasi indotta putativo 1 (PINK1), DJ-1 e ATP13A2. Nella maggior parte dei casi, le persone con queste mutazioni svilupperanno la malattia di Parkinson. Con l'eccezione di LRRK2, tuttavia, rappresentano solo una piccola minoranza dei casi della malattia. I geni correlati alla condizione e maggiormente studiati sono SNCA e LRRK2. Le mutazioni nei geni tra cui SNCA, LRRK2 e glucocerebrosidasi (GBA) sono stati individuati come fattori di rischio nello sviluppo della malattia di Parkinson. Il ruolo del gene SNCA è importante in quanto l'alfa-sinucleina alfa è il componente principale dei corpi di Lewy. Mutazioni missenso del gene (in cui un singolo nucleotide viene cambiato) e duplicazioni e triplicazioni del locus che lo contiene, sono state trovate in diversi gruppi aventi familiari affetti dalla malattia di Parkinson. Le mutazioni missenso sono rare. Tuttavia, moltiplicazioni del locus SNCA rappresentano circa il 2% dei casi familiari.

Il gene LRRK2 (PARK8) codifica per una proteina chiamata dardarina. Il nome dardarina è stato coniato da una parola basca che sta per tremore, poiché questo gene è stato identificato in famiglie provenienti dall'Inghilterra e dal nord della Spagna. Le mutazioni nel LRRK2 sono la causa più comune conosciuta di malattia di Parkinson familiare e sporadica, esse rappresentano circa il 5% degli individui con una storia familiare della malattia e il 3% dei casi sporadici. Vi sono molte differenti mutazioni descritte in LRRK2, la prova inequivocabile di causalità esiste, tuttavia, solo per un piccolo numero.

## **PATOLOGIE NEUROMUSCOLARI**

Le malattie neuromuscolari sono un gruppo eterogeneo di malattie neurologiche che comprendono le malattie muscolari, le neuropatie periferiche e la malattia del motoneurone.

Il periodo d'insorgenza dei sintomi, il quadro e l'andamento clinico variano a seconda del tipo di patologia così da poter distinguere forme lievi di malattie neuromuscolari e forme più gravi caratterizzate da una maggiore compromissione delle autonomie motorie, tra cui la perdita della deambulazione, e dalla possibile insorgenza di complicanze cardiache e respiratorie.

Le Malattie Neuromuscolari presentano nella maggior parte un andamento cronico progressivo, per alcune sono disponibili terapie che modificano la storia naturale (immunosoppressori, immunomodulanti), per altre è possibile solo il trattamento sintomatico.

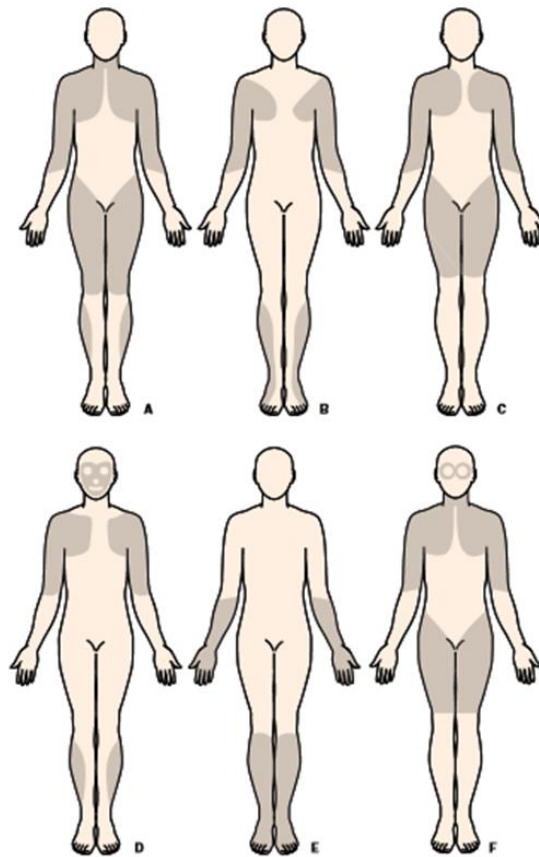
### **LE DISTROFIE MUSCOLARI**

Le distrofie muscolari sono disordini ereditari caratterizzati dall'assenza, dalla carenza o dall'alterazione di una proteina chiamata "distrofina" che portano alla degenerazione del tessuto muscolare con progressiva perdita delle forza muscolare e riduzione delle abilità motorie. Possono essere suddivise in diversi gruppi, includendo le forme congenite, in base alla distribuzione della debolezza muscolare predominante: Duchenne e Becker; Emery-Dreifuss; distali; facio-scapolo-omerale; oculofaringea e la distrofia dei cingoli che è il gruppo più eterogeneo.

I geni e le proteine che causano la maggior parte di queste patologie sono ora state identificate e ciò risulta essenziale per una diagnosi accurata. Ciò nonostante non esiste ancora un modo per affrontare gli effetti a lungo termine di queste patologie ma i progressi nella manipolazione dei geni e nella terapia con cellule staminali suggeriscono che, in un futuro non troppo distante, si possano trovare dei trattamenti effettivi.

### **Tipi di distrofie**

Basandosi sulla distribuzione principale della debolezza muscolare si possono definire sei forme primarie della patologia (Figura 1) con l'aggiunta della forma congenita nella quale la debolezza è più generalizzata.



**Figura 1:** Distribuzione della debolezza muscolare predominante in diversi tipi di distrofia: **A**, Duchenne e Becker; **B**, Emery-Dreifuss; **C**, cingoli; **D**, facio-scapolo-omerale; **E**, distale; **F**, oculo-faringea.

La **distrofia muscolare di Duchenne** è la patologia neuromuscolare più frequente dell'infanzia ed è la forma allelica più severa. L'incidenza è di 1 su 3500 maschi nati vivi. Si manifesta come patologia progressiva, i cui primi sintomi a carico degli arti inferiori appaiono tra il terzo e il quinto anno di vita. I bambini affetti da questa patologia cominciano a camminare in ritardo rispetto alla norma (più del 50% dei bambini DMD non camminano fino ai 18 mesi) e dimostrano difficoltà nella corsa. La debolezza muscolare progredisce fino al cingolo scapolare, i muscoli della parte superiore del tronco, e i pazienti perdono la capacità deambulatoria mediamente intorno ai 12 anni di età. Inoltre sin dalla nascita si riscontra un innalzamento importante del livello sierico dell'enzima creatina chinasi (CK) (20000-50000 U/L, rispetto agli 80-250 U/L nei non affetti), che spesso rappresenta un campanello di allarme per una diagnosi tempestiva. Polmonite e complicazioni cardiache sono la principale causa di morte che avviene solitamente nella tarda adolescenza o intorno ai primi vent'anni. Negli ultimi anni, gli affetti da DMD riescono a sopravvivere fino alla terza decade di vita grazie ad una maggior attenzione alla cura dell'apparato respiratorio e diverse forme di ventilazione assistita. Molti pazienti presentano un ingrossamento dei polpacci, tanto che inizialmente il termine per la patologia era

distrofia muscolare pseudo ipertrofica, ma questa ipertrofia non è un sintomo solo della distrofia della Duchenne, ma è presente anche in altre distrofie, ad esempio quella di Becker.

Nella **distrofia di Becker** la distribuzione della debolezza e della degenerazione muscolare è simile a quella di Duchenne ma il decorso della malattia è più lieve e benigno. Infatti i primi sintomi si presentano intorno ai 12 anni e alcuni pazienti non presentano sintomi se non molti anni dopo (Emery, 2002). I pazienti colpiti in modo più severo muoiono tra i 40 e i 50 anni, invece quelli colpiti solo lievemente hanno un'aspettativa di vita normale. Il gene della Duchenne è localizzato sul Xp21, il quale colpisce la proteina distrofina ed è allelico con la distrofia di Becker. La distrofina solitamente è assente nei pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne anche se in rari casi si può trovare, è invece ridotta in concentrazione e dimensione in quella di Becker.

La **distrofia muscolare di Emery Dreifuss** è caratterizzata dalla manifestazione di tre sintomi: il primo si manifesta con contratture precoci del tendine D'Achille, gomiti e muscoli cervicali posteriori, con iniziale limitazione della flessione del collo e poi con anche quella frontale dell'intera colonna vertebrale. Il secondo sintomo è caratterizzato da una progressiva debolezza e degradazione muscolare con distribuzione omero-peroneale, ovvero prossimale negli arti superiori e distale in quelli inferiori, poi la parte prossimale della muscolatura del cingolo viene compromessa.

Come terzo sintomo ritroviamo la cardiomiopatia, con difetti di conduzione del segnale da bradicardia, allungamento dell'intervallo PR fino ad arrivare all'arresto cardiaco.

La Emery-Dreifuss è causata dalla mutazione del gene STA sul cromosoma X in posizione q28, che codifica per la proteina di membrana detta emerina. In quasi tutti i casi di questa distrofia c'è una totale assenza della suddetta proteina nella muscolatura.

La **distrofia muscolare distale** può essere divisa in due gruppi principali, il primo, con ereditarietà autosomica dominante e con inizio in età adulta (sopra i 40 anni), il secondo invece con ereditarietà autosomica recessiva e sviluppo prima dei 30 anni. Le cause di queste distrofie sono sconosciute. Dato che l'istologia del muscolo dei soggetti presenta variazioni nelle dimensioni delle cellule e dei vacuoli, piuttosto che mutamenti distrofici, queste patologie sono più associabili a miopatie che a distrofie.

La **distrofia facio-scapolo-omerale** prende il nome dai gruppi muscolari prevalentemente intaccati, faccia e cingolo scapolo omerale ma, successivamente colpisce anche gli estensori del piede e i muscoli del cingolo pelvico. Nella maggior parte dei casi il cuore non è coinvolto nella patologia, anche se in alcuni casi sono state riscontrati difetti di conduzione e aritmie. Solitamente non si presentano disturbi cognitivi, ma si possono avere patologie a carico degli occhi e perdita di udito.

La patologia è associata a delezione di un tratto subtelomerico del cromosoma 4q, ma la funzione dei geni che causano questa patologia non sono ancora chiari.

Nella **distrofia oculo-faringea** i primi sintomi si manifestano nella terza decade e colpiscono i muscoli extraoculari, i muscoli facciali della parte alta del volto con ptosi, debolezza dei muscoli del collo e di quelli prossimali degli arti. La disfagia e la ptosi sono due conseguenze gravi e presenti in molti casi. I soggetti affetti da questa patologia hanno da 2 a 7 ripetizioni della tripletta GCG e questo ostacola il normale trasporto del mRNA dal nucleo.

La **distrofia dei cingoli**, indicata di solito come LGMDs, costituisce un gruppo eterogeneo di malattie geneticamente determinate, coinvolgenti in maniera primitiva la muscolatura dei cingoli, sia pelvico (inferiore) che scapolare (superiore). Il decorso clinico è **estremamente variabile**, con forme gravi ad insorgenza precoce e rapida progressione e forme di minore entità che permettono agli individui che ne sono affetti una quasi normale aspettativa di vita e di autonomia motoria.

Le forme **dominanti** (*LGMD1A-LGMD1G*) sono di solito più benigne e relativamente rare, rappresentando meno del 10% di tutte le distrofie dei cingoli.

Le forme **recessive** (*LGMD2A-LGMD2O*) sono molto più frequenti e presentano una prevalenza globale di 1 persona affetta su 15.000, con una diversa distribuzione geografica.

## **DISTROFINOPATIE**

Le distrofie muscolari di Duchenne (DMD) e di Becker (BMD) sono due varianti, rispettivamente più e meno grave, della stessa malattia neuromuscolare caratterizzata dall'assenza, carenza o alterazione della proteina distrofina.

### **DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE**

La forma più comune di distrofia muscolare è la distrofia muscolare di Duchenne (DMD), che deve il suo nome al neurologo francese Guillaume Duchenne (1806-1875) che la descrisse nel 1861, anche se non fu il primo. La DMD interessa un bambino ogni 3.500 nati vivi e si manifesta generalmente fra i 2 e i 5 anni di età. La distrofia muscolare di Duchenne è dovuta a un'alterazione del gene DMD. Tale alterazione fa sì che la distrofina non venga sintetizzata ed è quindi totalmente assente. Le alterazioni che possono causare la mancata o diminuita produzione della proteina possono essere:

6-10% duplicazioni

30-35% mutazioni puntiformi

65% delezioni.



In genere i pazienti affetti da DMD sono portatori di mutazioni che causano una terminazione prematura della traduzione (mutazioni nonsense o frame-shift), mentre nei pazienti con BMD la distrofina presenta un peso molecolare ridotto (derivante da delezioni che mantengono la cornice di lettura) o una riduzione dei livelli di espressione.

Sebbene in ogni individuo sia possibile un diverso andamento clinico, in linea di massima la storia naturale della distrofia di Duchenne determina gli stessi disturbi motori. I muscoli distrofici hanno in genere distrofina assente o fortemente ridotta. Poiché la distrofina è una proteina essenziale per la stabilità della membrana plasmatica, la contrazione muscolare indotta dal sarcomero induce danni progressivi alla membrana e questo, successivamente, determina l'attivazione della cascata infiammatoria. Tali processi portano alla necrosi delle cellule muscolari, fibrosi e perdita di funzionalità. Nella maggioranza dei casi, la diagnosi si pone in base ad anomalie posturali statiche e dinamiche, causate da una progressiva debolezza muscolare che può manifestarsi già nell'infanzia. Inizialmente colpiti sono i muscoli delle cosce e delle anche, con conseguente difficoltà di deambulazione autonoma che viene acquisita con lieve ritardo, per questo l'American Academy of Pediatrics suggerisce il test per il siero CK (campanello di allarme per una diagnosi tempestiva) in tutti i casi di ritardo motorio.

Già nei primi anni di vita il bambino presenta un'andatura anserina (ondulante/basculante) e tende a camminare sulle punte, ha difficoltà a saltare, a salire le scale e, in generale, camminare lo stanca con facilità. La debolezza muscolare può essere dimostrata dalla cosiddetta manovra di Gower per alzarsi dalla posizione supina: spingendosi sulle mani, le appoggia poi sul pavimento; in seguito le pone sulle ginocchia e sulle cosce per spingere in alto la parte superiore del corpo e raggiungere così la posizione eretta che ha però un atteggiamento lordotico.

Con il progredire della malattia aumentano iperlordosi lombare e pseudoipertrofie e ipertrofie muscolari compensatorie, in particolare dei polpacci che perdono elasticità e mascherano l'ipotrofia muscolare. La scoliosi si sviluppa nel 90% dei ragazzi che sono totalmente dipendenti da ausili motori intorno agli 8-10 anni e potrebbe richiedere una correzione chirurgica. Lo sviluppo di scoliosi nel paziente non deambulante rappresenta infatti una delle complicanze maggiori in grado di interferire con la funzionalità respiratoria e cardiaca creando un danno che è causa di morte, intorno al secondo o terzo decennio di vita. I pazienti con DMD sviluppano quasi invariabilmente una cardiomiopatia dilatativa che compromette ulteriormente il quadro cardiorespiratorio ed è oggi considerata la causa principale di decesso, visti i notevoli progressi nelle cure respiratorie e nella ventilazione assistita.

Sebbene il coinvolgimento della muscolatura sia generalizzato, alcuni gruppi muscolari sono più interessati di altri e questo può determinare coinvolgimenti asimmetrici e favorire lo sviluppo di

retrazioni articolari e scoliosi. I primi deficit muscolari compaiono agli arti inferiori. Soltanto in un momento successivo, insorgono anche a carico di quelli superiori. Successivamente il difetto di forza progredisce ulteriormente, coinvolgendo anche la muscolatura cardiaca e respiratoria. Non vengono invece interessati i muscoli oculari estrinseci (quelli che consentono di muovere gli occhi) ed è poco coinvolta la muscolatura mimica del volto. I bambini Duchenne possono mostrare anomalie al sistema nervoso centrale. Al contrario della compromissione muscolare i deficit cognitivi non sono progressivi poichè la mancanza della distrofina nel cervello e nella retina non provoca difetti morfologici evidenti. Il quoziente intellettivo medio è al di sotto del valore medio della popolazione, circa il 30% dei pazienti ha un  $QI < 75$ . Analisi dettagliate delle funzioni cognitive indicano che, per prima, è affetta l'intelligenza verbale, mentre gli altri processi cognitivi restano relativamente integri.

## **2.2 DISTROFIA MUSCOLARE DI BECKER**

La Distrofia Muscolare di Becker è la forma allelica più lieve dove la distrofina è “difettosa” o ridotta, ma mai del tutto assente e colpisce 1:15000 maschi. Anche i pazienti BMD soffrono di debolezza muscolare, ma il decorso della malattia è molto meno grave rispetto alla DMD ed ha esordio più tardivo. Il fenotipo varia da molto lieve a moderatamente severo. I sintomi esordiscono attorno ai 12 anni di vita ma la manifestazione può essere molto variabile.

La maggioranza dei pazienti manifesta difficoltà di deambulazione circa 20- 30 anni dopo l'esordio della malattia anche se molti riescono a camminare per molto più tempo. Debolezza ed atrofia muscolare compaiono inizialmente nei muscoli del cingolo pelvico e della coscia, con difficoltà a salire le scale e ad alzarsi da terra. Vengono coinvolti i muscoli del cingolo scapolare e degli arti superiori, senza l'interessamento della muscolatura distale. Circa il 50% degli affetti soffre di cardiomiopatia dilatativa simile a quella presente nella forma Duchenne. I pazienti colpiti in modo più severo muoiono tra i 40 e i 50 anni, invece quelli colpiti solo lievemente hanno un'aspettativa di vita quasi normale.

## **2.1 DISTROFINA: GENE, PROTEINA**

Il gene distrofina è localizzato nel braccio corto del cromosoma X, al locus Xp21.2 (fig. 1). E' il gene più grande del genoma umano, con una dimensione di circa 2,4 Mb, corrispondenti a circa lo 0.1% di tutto il genoma umano e a circa l'1.5% dell'intero cromosoma X. Il 99% della sequenza genica è costituita da introni di estese dimensioni, mentre la sua parte codificante (0.6% dell'intera sequenza genica) comprende 79 esoni. Contiene 8 promotori e 2 siti di poliadenilazione; lo splicing alternativo dei diversi esoni produce diverse isoforme tessuto specifiche.

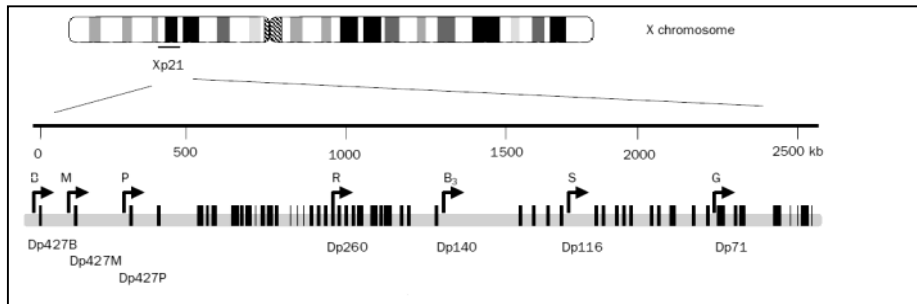


Figura 1. Gene della distrofina

La malattia si trasmette con modalità recessiva legata all’X: in genere solo i maschi, che hanno solo un cromosoma X, presentano i sintomi.

La proteina distrofina è una proteina del citoscheletro e fa parte del complesso distrofina-glicoproteine situato tra la matrice extracellulare e il citoscheletro delle fibre muscolari. La distrofina full-length (**Dp427m**) è una grande proteina costituita da 3685 aminoacidi ed ha un peso molecolare di 427 KDa. La proteina è composta da quattro domini: un dominio N-terminale di legame all’ actina, 24 unità ripetute spettro simili intervallate da quattro regioni a cerniera, seguite da un dominio ricco di cisteina e un dominio C-terminale (Fig.2).

Fisiologicamente la distrofina agisce come una sorta di ammortizzatore, fornendo resistenza alla deformazione, durante la contrazione muscolare.

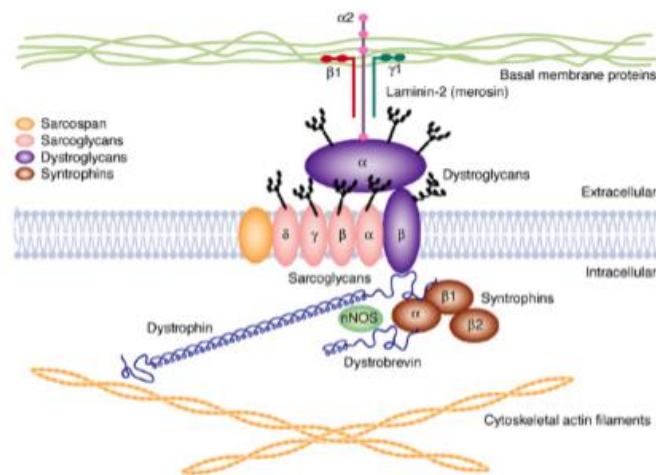


Figura 2. Il complesso distrofina-glicoproteine (DGC: Dystrophin Glycoprotein Complex)

È associata al sarcolemma, localizzata in prossimità della faccia citoplasmatica della membrana muscolare, cui è ancorata tramite un complesso di molte altre proteine, detto complesso della distrofina (DGC), che viene a formare una struttura ponte, uno stabile collegamento tra matrice extracellulare e citoscheletro (intelaiatura di sostegno della fibra muscolare). L'importanza della distrofina è determinante per la stabilità meccanica della membrana durante la contrazione muscolare, infatti il suo ruolo è quello di rinforzare la fibra muscolare e di permetterle di sopportare lo stress meccanico causato dalla contrazione. La sua assenza o riduzione rende appunto il sarcolemma particolarmente sensibile alla rottura durante la contrazione muscolare. Come conseguenza del danno si avrebbe ingresso di calcio e attivazione di proteasi endogene  $Ca^{2+}$  sensibili ed innesco di una serie di eventi che culminerebbero nella necrosi delle fibre. Il danno di membrana è inoltre responsabile del passaggio nel siero di enzimi citosolici tra cui la creatin-chinasi (CK).

### **TERAPIA CON CORTICOSTEROIDI**

Nella distrofia muscolare di Duchenne l'unica terapia che, in seguito a vari studi controllati, ha dimostrato nel corso degli anni, essere efficace è quella con corticosteroidi.

Importante sottolineare che questa terapia non è da considerarsi curativa bensì palliativa: essa agisce rallentando la progressione della malattia e riducendone la severità.

I due corticosteroidi maggiormente utilizzati sono il prednisone e il deflazacort; il primo generalmente somministrato alla dose di 0,75 mg/kg/die, mentre il deflazacort alla dose di 0,9 mg/kg/die; un'ulteriore differenza è legata al fatto che il deflazacort ha mostrato un minore effetto demineralizzante a livello osseo mentre il prednisone ha riportato un minore effetto sull'incremento ponderale.

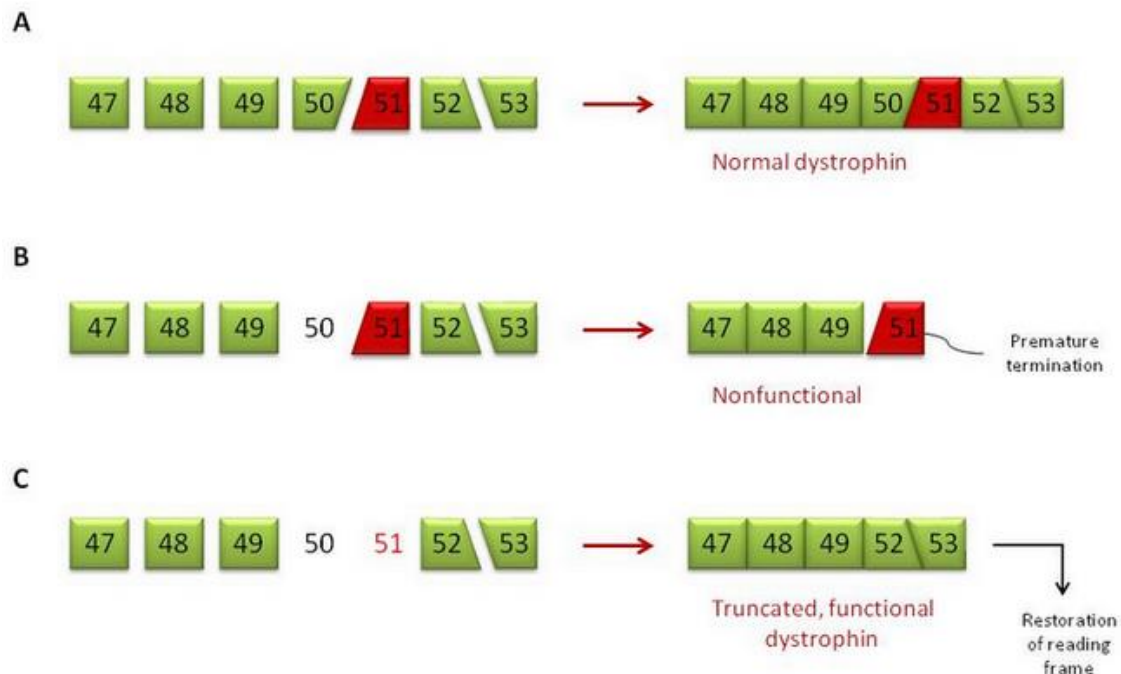
In generale si ipotizza che gli steroidi riducano la necrosi muscolare, andando invece a stimolare la proliferazione dei mioblasti e ad agire sul metabolismo proteico e che abbiano un ruolo antiinfiammatorio, modulando la risposta cellulare all'infiammazione.

### **EXON SKIPPING**

L'obiettivo di questo approccio terapeutico è quello di trasformare il fenotipo grave della DMD in una forma più lieve come quella della BMD permettendo al paziente notevoli miglioramenti nelle prestazioni fisiche, respiratorie e cardiache.

Lo "skipping esonico" mediato da oligonucleotidi antisenso (AON) è una delle terapie più promettenti e attualmente testata in vari trials clinici. L'idea alla base di questa strategia è quella di ripristinare la cornice di lettura nel trascritto mutato, al fine di consentire la produzione di una proteina più corta,

ma parzialmente funzionale, trasformando così il fenotipo grave DMD in una forma più lieve, simile al fenotipo che caratterizza la distrofia muscolare di Becker (BMD) (Fig. 2). Diversi studi hanno dimostrato che la tecnica dello skipping esonico induce la produzione di distrofina nel topo, nel cane e anche in pazienti DMD.



**Figura 2: le alterazioni della corretta cornice di lettura della distrofina della Distrofia Muscolare di Duchenne possono essere corrette mediante lo “skipping” di un ulteriore esone. A) La traduzione dell’ mRNA di una distrofina normale genera una proteina completa che contiene tutti i domini essenziali ed è completamente funzionale. B) La delezione dell’ esone 50 o delezioni più grandi che terminano all’ esone 50 alterano la corretta cornice di lettura a valle della mutazione, impedendo la traduzione della proteina e causando la patologia. C) Lo skipping dell’ esone 51 indotto dall’ antisense riporta la corretta sequenza di lettura e permette la traduzione di una proteina troncata internament, ma parzialmente funzionale. Questa terapia può convertire il fenotipo grave DMD nella forma più lieve , BMD.**

Lo studio degli oligonucleotidi antisense per lo skipping esonico è diventato di grande interesse, tuttavia ci sono alcuni limiti da superare, riguardanti l’efficacia e la sicurezza, in modo da rendere queste molecole dei farmaci ottimali per il loro utilizzo nella terapia. L’AON ideale dovrebbe essere: i) specifico per la sequenza bersaglio sull’ RNA, ii) captato in modo veloce ed efficace dalle cellule nei tessuti interessati e iii) attivo nel compartimento intracellulare appropriato. Il progresso di questo tipo di terapia dipende dallo sviluppo di nuovi vettori per la loro veicolazione per la somministrazione sistemica.