

MR

Il **Q**uaderno delle **M**alattie **R**are

Congress Report

La malattia di Niemann Pick di tipo C: dal fenotipo alla diagnosi di malattia

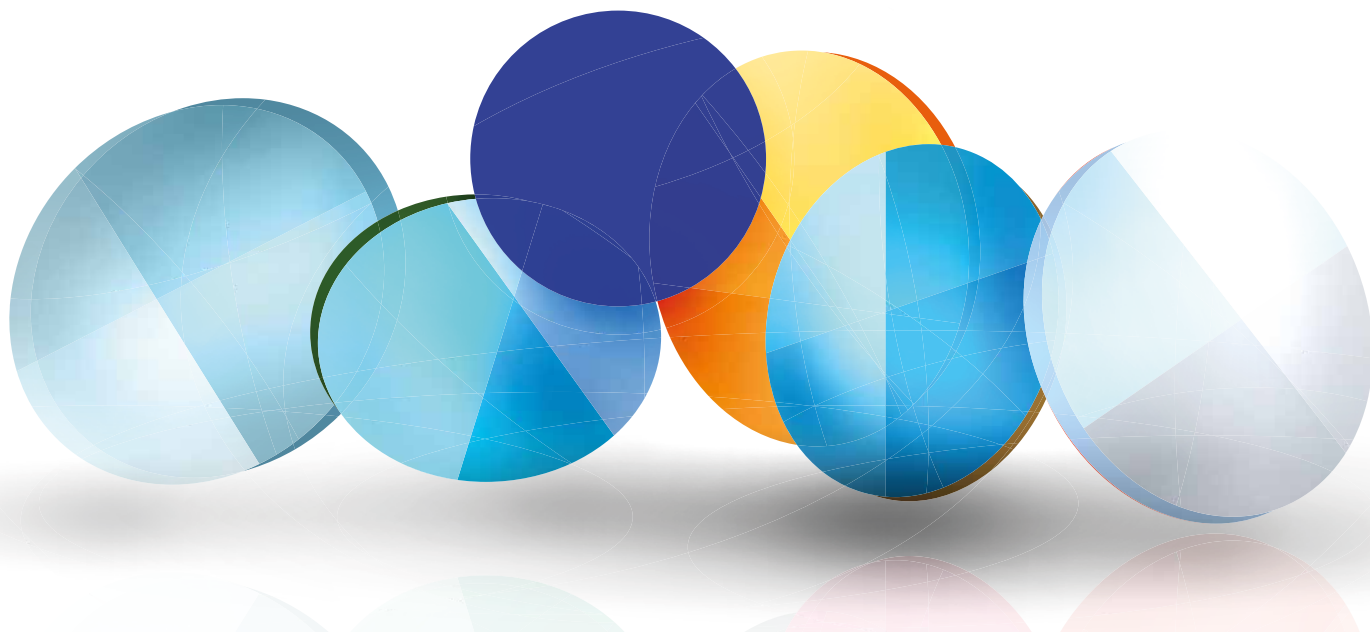
La complessità clinica del fenotipo NPC adulto

Nuovi metodi di indagine clinica

Eterozigoti: definizione clinica e diagnostica

Le manifestazioni psichiatriche nella NPC

Approccio terapeutico e risultati nelle forme di NPC
adulte e giovanili





Introduzione

- NPC: dal fenotipo alla diagnosi di malattia *pag. 4*

Inquadramento clinico

- La Malattia di Niemann Pick di tipo C *pag. 6*

La complessità clinica del fenotipo NPC adulto

- I quadri clinici atipici nelle forme giovanili e adulte *pag. 10*
- Screening in pazienti con problemi di movimento e decadimento cognitivo *pag. 12*
- Pazienti "Huntington like": un nuovo fenotipo per la malattia di Niemann Pick di tipo C? *pag. 14*

Nuovi metodi di indagine clinica

- Ruolo dell'imaging neurologico nell'indagine diagnostica e nel follow-up terapeutico *pag. 16*
- EyeSeeCam: la video-oculografia nella diagnosi e follow up terapeutico *pag. 18*
- Nuovi biomarker neurofisiologici per la malattia di NPC *pag. 20*

Eterozigoti: definizione clinica e diagnostica

- Il processo diagnostico e i casi non risolti: veri eterozigoti o limiti tecnici *pag. 22*
- I quadri di eterozigosi: problematiche aperte *pag. 25*

Le manifestazioni psichiatriche nella NPC

pag. 26

Approccio terapeutico e risultati nelle forme di NPC adulte e giovanili

pag. 28



NPC: dal fenotipo alla diagnosi di malattia

La malattia di Niemann Pick tipo C (NPC) è una rara patologia da accumulo lisosomiale, causata dal difetto di una delle due proteine deputate al trasporto intralisosomiale del colesterolo: NPC1 ed NPC2. La conseguenza è l'accumulo di colesterolo non esterificato e altri lipidi nei lisosomi, che porta al danno cellulare in organi target quali fegato e milza, ma soprattutto a livello del Sistema Nervoso Centrale con una neurodegenerazione progressiva.

Lo **spettro fenotipico** della malattia è estremamente variabile, andando da forme molto severe, con diagnosi solitamente in epoca infantile, a forme molto sfumate, che possono rendersi evidenti solo nell'età adulta ed essere facilmente confuse con altre patologie. I sintomi clinici classici della malattia di NPC includono: epato-splenomegalia (solitamente nell'infanzia), ritardo dello sviluppo psicomotorio, deficit cognitivo, atassia, distonia, disfagia, disartria, paralisi dello sguardo verticale e disturbi psichiatrici.

La malattia è ereditata come tratto autosomico recessivo, occorre pertanto che per manifestare la malattia la persona affetta abbia una mutazione patogena su entrambi gli alleli del gene NPC1 o NPC2. Viene trasmessa da genitori portatori sani. L'incidenza della malattia di NPC è stata stimata in circa 1/100.000-1/200.000 nati, tuttavia i nuovi test di screening introdotti nella diagnostica biochimica e le nuove tecnologie di genetica molecolare, nonché la conoscenza maggiore della patologia da parte dei medici, sta portando ad **un numero sempre maggiore di casi identificati**, per cui i dati attualmente stimati di incidenza della malattia subiranno una drastica modifica nel prossimo futuro. L'iter diagnostico classico della malattia prevede:

1) il sospetto clinico

2) l'esecuzione della biopsia cutanea per eseguire il test di Filipin su fibroblasti in coltura che evidenzia, in caso di malattia, l'accumulo cellulare di colesterolo non esterificato

3) la conferma di patologia tramite analisi molecolare dei geni NPC1 ed NPC2.

L'iter descritto è lungo ed indaginoso e viene attivato dal sospetto clinico forte di malattia (presenza di una sintomatologia caratteristica).

La **disponibilità di nuovi marker terapeutici** nell'ultimo triennio ha reso più facile confermare un sospetto diagnostico anche in una situazione clinica "non-classica". Il dosaggio degli ossisteroli plasmatici mediante un semplice prelievo di sangue ha allargato di molto il numero di approfondimenti diagnostici, anche in situazioni di sospetto clinico "debole" di malattia, il risultato del test in caso di positività va comunque confermato tramite l'analisi molecolare.

Un passo avanti è stato recentemente fatto grazie alla disponibilità della **tecnologia della Next Generation Sequencing**, che ha permesso di inserire i geni della malattia di NPC in appropriati pannelli "neurologici", utilizzati per la diagnosi di pazienti con sintomi neuro-psichiatrici non meglio spiegati.

Le possibilità diagnostiche attuali aprono nuovi scenari quali l'individuazione della patologia in fenotipi molto distanti da quelli classici e l'individuazione di quadri di eterozigosi che lasciano aperti interrogativi di rilievo, per rispondere ai quali numerosi esperti della patologia si sono confrontati durante il workshop di Udine "La malattia di Niemann Pick tipo C: le forme adulte e i quadri di eterozigosi" coordinato per la parte scientifica dalle dottoresse Andrea Dardis e Annalisa Sechi e per la parte organizzativa dalla dottoressa Serena Valent.

Quale è il senso, oggi, dell'approfondimento di un aspetto così particolare come quello della diagnosi di eterozigosi in pazienti affetti da sintomi neurologici che fanno sospettare la presenza di una Malattia di Niemann-Pick C?

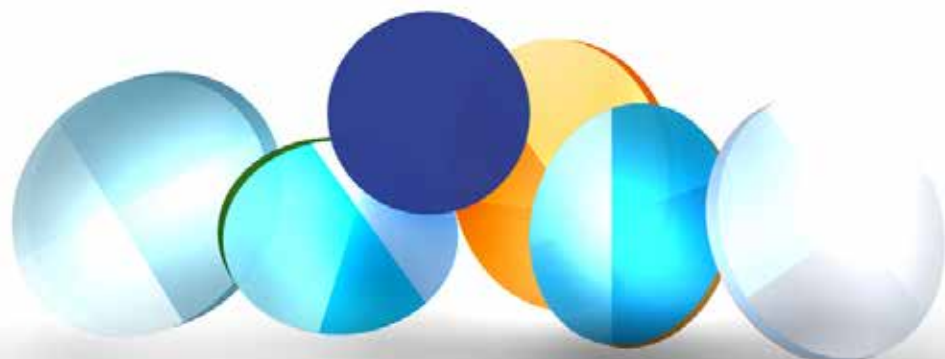
Non potrebbe essere un falso problema, un errore diagnostico, la spia dell'incapacità di riscontrare la seconda mutazione? Certo, così potrebbe essere. In questo caso però "l'errore" sarebbe circoscritto ad un laboratorio, qualche centro clinico o alcuni professionisti. Quando l'osservazione diventa più larga è invece indice di un qualcosa di nuovo che iniziamo a vedere e ancora non comprendiamo.

E' quindi possibile che anche gli eterozigoti siano sintomatici? Va perciò rivista l'ereditarietà della malattia? Quanti dei pazienti individuati come eterozigoti sono veri eterozigoti e quanti invece hanno una seconda mutazione che non si riesce a trovare? L'**individuazione dei "veri" pazienti** diventa importante alla luce delle possibilità terapeutiche attuali e future della patologia.

In questa direzione il campo delle patologie lisosomiali si è dimostrato un settore d'avanguardia, evidenziando l'interazione esistente tra meccanismi fisiopatologici di malattie neurodegenerative storicamente conosciute e la possibile riduzione dell'attività di enzimi lisosomiali. Precorritrice di questi studi è stata la dimostrazione della relazione tra una sindrome Parkinsoniana precoce e la malattia di Gaucher, sia franca che in situazione di portatore. La scoperta delle modalità di cooperazione tra alfa-sinucleina e beta-glucosidasi, nel meccanismo del danno da accumulo nelle cellule della sostanza nigra nella malattia di Parkinson, ha stimolato l'attenzione sul ruolo dell'alterata funzione lisosomiale nelle malattie di Alzheimer e Niemann-Pick C.

Una strada si sta aprendo e la comunità dei ricercatori e clinici del nostro Paese è sicuramente presente ed attrezzata per percorrerla. La possibilità di percorrerla insieme, in "carovana", ci rende più forti e capaci sia per comprendere meglio sia per dare le migliori risposte ai malati e alle loro famiglie.

Bruno Bembi



La Malattia di Niemann Pick di tipo C

Annalisa Sechi, Bruno Bembi Centro di Coordinamento Regionale per le Malattie Rare, AOJ Santa Maria della Misericordia, Udine

Con il termine "malattia di Niemann Pick" si identifica un gruppo di malattie rare differenti, accumulate da una sintomatologia in alcune fasi simile e dall'accumulo lisosomiale di glicosfingolipidi e colesterolo, ma differenti sia geneticamente che per decorso clinico. Nello specifico, la malattia di Niemann Pick tipo A e B è secondaria ad un deficit dell'enzima sfingomielinasi acida lisosomiale, mentre la malattia di Niemann Pick tipo C (NPC) è causata da un'alterazione del sistema di trasporto del colesterolo nel sistema endocitico-li-

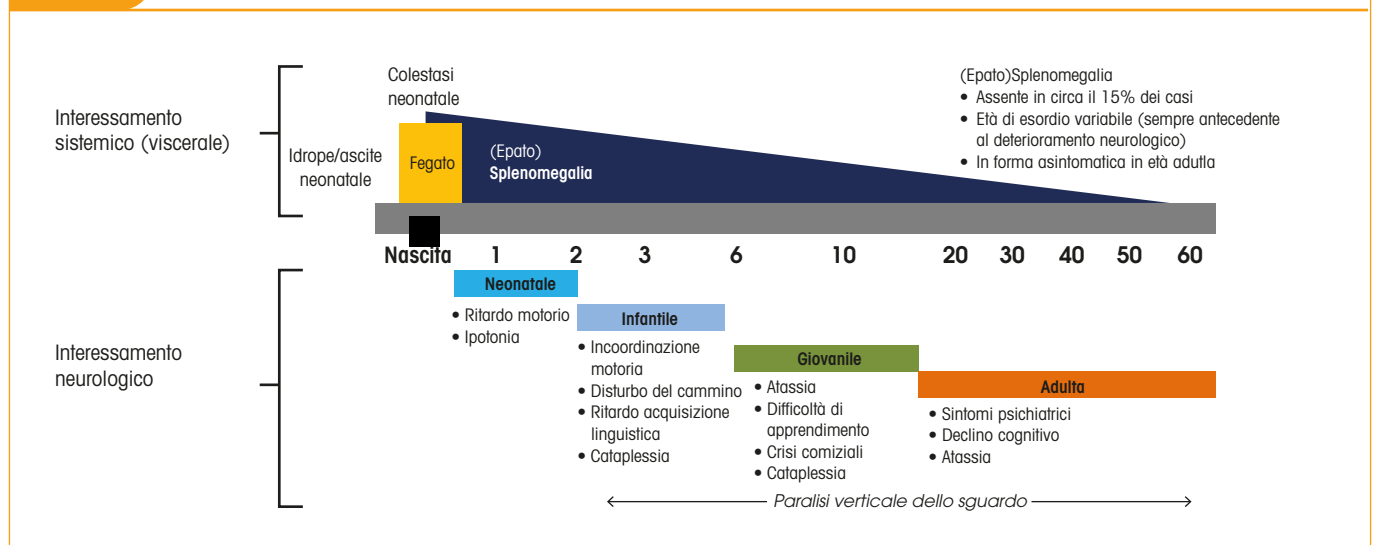
sosomiale, con conseguente accumulo di colesterolo non esterificato, sfingomielina e glicosfingolipidi nei lisosomi e late-endosomi. In questo Quaderno parleremo solo della malattia di NPC.

La malattia di NPC è una patologia metabolica lisosomiale causata dalle mutazioni del gene NPC1 (95% dei pazienti) o NPC2 (5% dei pazienti) che codificano per le rispettive proteine di trasporto, situate rispettivamente sui cromosomi 18 e 14.

Ambedue le forme vengono ereditate con modalità autosomica recessiva. Il gene NPC1 è molto lungo, essendo composto da 25 esoni, mentre il gene NPC2 è composto da 5 esoni. Ad oggi sono state individuate più di 250 mutazioni patogenetiche e numerosi polimorfismi non causanti malattia.

La NPC, patologia metabolica lisosomiale, presenta una importante variabilità fenotipica, causa di mancata diagnosi soprattutto in età adulta

Fig. 1 Manifestazioni sistemiche e neurologiche della malattia di NPC





Dal punto di vista clinico l'affinamento delle metodiche diagnostiche e la disponibilità di una terapia dedicata (miglustat) ha permesso di evidenziare una **notevole variabilità fenotipica**, che può essere responsabile di mancata diagnosi, specie in età adulta.

La malattia presenta generalmente un mix di sintomi sistemici e neurodegenerativi che prevalgono rispettivamente nelle diverse epoche di vita dei pazienti.

L'età di esordio varia dall'epoca neonatale all'età adulta. La malattia sistemica, prevalente nel primo anno di vita, si manifesta con epato-splenomegalia, anche imponente, che anticipa spesso i sintomi neurologici e psichiatrici, per poi regredire con il tempo. Viceversa i sintomi della neurodegenerazione progrediscono nel tempo, fino a diventare fortemente invalidanti. In linea generale quanto più precoce è la sintomatologia, più severo e rapido è il decorso di malattia. In base all'età di esordio si possono distinguere le seguenti forme cliniche di malattia, sebbene in realtà la malattia va intesa come un **continuum fenotipico** dai quadri neonatali ai fenotipi adulti (Figura 1).

Il **fenotipo neonatale** è quello ad evoluzione più severa ed acuta, in genere si manifesta con un importante aumento dei volumi di fegato e milza e segni di compromissione della funzionalità epatica. Può essere presente già alla nascita, spia del suo sviluppo in epoca fetale con un quadro di idrope fetale, spesso ascite e ittero colestatico prolungato. L'aspettativa di vita di questi pazienti in genere non supera i primi due anni, con *exitus* dovuto ad un quadro di insufficienza epatica progressiva o, più raramente, per grave insufficienza respiratoria.

La malattia, continuum fenotipico dai quadri neonatali ai fenotipi adulti, può esordire con un interessamento sistemico che anticipa i sintomi neurologici e psichiatrici progressivi

Nelle **forme precoci-infantili**, l'ittero neonatale regredisce e non ci sono complicanze respiratorie, ma compaiono severe manifestazioni neurologiche tra i 3 mesi e i 2 anni di vita, con ipotonia e ritardo/regressione psicomotoria, che portano a morte solitamente entro i 5 anni di vita. Nelle forme tardo-infantili l'insorgenza dei sintomi neurologici si ha tra i 2 anni e i 6 anni con difficoltà del cammino e ritardo del linguaggio.

Le **forme giovanili** si manifestano tra i 6 e i 15 anni in genere con epato-splenomegalia più modesta, difficoltà di apprendimento, disturbi dell'equilibrio e del cammino con atassia, disturbi della motilità oculare progressiva con paralisi dei movimenti oculari verticali e cataplessia gelastica. Quest'ultima è un fenomeno per il quale in presenza di forti emozioni o di forti risate il paziente ha un'improvvisa perdita di tono muscolare generalizzata. Con il tempo la sintomatologia neurologica si complica con atassia progressiva, disfagia, disartria, deficit cognitivi, sintomi piramidali e spasticità. I problemi di deglutizione spesso portano alla necessità di posizionamento di una gastrostomia. Circa la metà dei pazienti sviluppa epilessia, spesso farmaco-resistente. La sopravvivenza in questi casi può arrivare fino ai 30 anni.

Le **forme ad insorgenza in età adulta** (anche oltre i 60 anni) sono più insidiose e più difficili da riconoscere. I sintomi periferici possono essere assenti, anche se

spesso in anamnesi i pazienti hanno una storia di ittero neonatale e quello che predomina è il coinvolgimento del Sistema Nervoso Centrale. Alcuni pazienti hanno manifestazioni prevalentemente neurologiche (atassia, disartria, disfagia, distonia) mentre altri hanno un quadro prevalentemente psichiatrico (allucinazioni, psicosi, disturbi del comportamento, depressione) o di demenza. Raramente si manifesta epilessia.

Vista la molteplicità di presentazione della malattia, per facilitare il sospetto diagnostico è stato sviluppato uno **score index**, (rintracciabile sul sito <http://www.npc-si.com/tools>) in cui sono stati individuati 7 sintomi chiave, correlati ad un punteggio di gravità (Figure 2 e 3).

In base al punteggio complessivo raggiunto la probabilità di trovarsi di fronte ad un paziente con NPC è definita come bassa, moderata o alta. Per i pazienti con probabilità di malattia moderata viene suggerito l'invio per un ulteriore inquadramento clinico-strumentale, mentre per i pazienti con alta probabilità viene indicato il passaggio diretto alla fase di diagnosi biochimica e molecolare.

Per quanto riguarda le **possibilità terapeutiche**, l'unica terapia specifica per la malattia di NPC attualmente disponibile in commercio è miglustat, un immi-nozucchero che inibisce la sintesi dei glicosfingolipidi, indicato per il trattamento dei sintomi neurologici sia nei pazienti pediatrici che adulti.

Studi di letteratura hanno dimostrato come il farmaco sia in grado di stabilizzare o rallentare la progressione della malattia.

Miglustat viene assunto per bocca, sotto forma di compresse da 100mg, ad un dosaggio per i pazienti adulti di 2 cps x 3/die; nei bambini la dose deve essere aggiustata in base alla superficie corporea.

Il farmaco può dare effetti collaterali gastrointestinali per la sua attività di inibizione delle disaccaridasi intestinali. Per tale motivo nei primi mesi di terapia si raccomanda una dieta povera di zuccheri semplici ed il trattamento con fermenti lattici.

Sono attualmente in fase di studio nuovi farmaci ed alcuni trial clinici sono in corso nell'uomo. Di questi farmaci, i più promettenti sembrano essere ciclodestrine e arimoclomol.

Fig. 2 NPC Suspicion Index nei pazienti da 0 a 4 anni

	SNC	MILZA	FEGATO	POLMONE	NASCITA	ANAMNESI FAMILIARE
Molto forte						Genitore/fratello-sorella con NPC
Forte		Splenomegalia		Infiltrati polmonari		
Moderato	Cataplessia gelastica		Ittero prolungato			
Debole	Paralisi sopranucleare verticale dello sguardo		Iperbilirubinemia diretta		Idrope fetale o ascite	
Accessorio			Epatomegalia			
Combinazioni	Ritardo mentale Atassia					

Modificato da Pineda M et al, BMC Pediatr 2016;16:107

Nei pazienti con probabilità di malattia moderata si suggerisce l'invio per un ulteriore inquadramento, nei pazienti con probabilità alta si suggerisce la diagnosi biochimica e molecolare



Fig. 3 NPC Suspicion Index nei pazienti >4 anni

	VISCERALE	NEUROLOGICA	PSICHIATRICA	ANAMNESI FAMILIARE
Molto forte		<ul style="list-style-type: none"> • Cataplessia gelastica • Paralisi sopranucleare verticale dello sguardo 		<ul style="list-style-type: none"> • Genitore/fratello-sorella con NPC
Forte	<ul style="list-style-type: none"> • Splenomegalia isolata inspiegata (in atto o pregressa) con o senza epatomegalia associata • Ittero neonatale prolungato inspiegato o coleastasi 		<ul style="list-style-type: none"> • Declino cognitivo presenile o demenza 	<ul style="list-style-type: none"> • Cugino/a con NPC
Moderato		<ul style="list-style-type: none"> • Distonia • Disartia e/o disfagia • Atassia, goffaggine o frequenti cadute 	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomi di tipo psicotico (allucinazioni, delirio paranoide e/o disturbo del pensiero) 	
Debole		<ul style="list-style-type: none"> • Spasticità acquisita e progressiva 	<ul style="list-style-type: none"> • Altri disturbi psichiatrici • Sintomi psichiatrici resistenti al trattamento farmacologico 	
Accessorio	<ul style="list-style-type: none"> • Fratello/sorella con ascite fetale • Idrope fetale 	<ul style="list-style-type: none"> • Ipotonia • Mioclono • Crisi comiziali parziali o generalizzate • Ritardo nelle principali tappe dello sviluppo 	<ul style="list-style-type: none"> • Comportamento dirompente o aggressivo nell'infanzia o adolescenza 	

Modificato da Hendriksz CJ et al, Journal of Rare Disorders 2015; 1:11

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi utilizzati comunemente nell'industria cosmetica e alimentare. Sono state studiate nella malattia di Niemann-Pick per la loro capacità di mobilizzare i lipidi intracellulari, riducendo potenzialmente l'accumulo di colesterolo nei lisosomi. Il trattamento con ciclodestrine è stato proposto sia per via endovenosa che per via intratecale. I risultati descritti in letteratura sono ancora scarsi e relativi a singole esperienze su una casistica molto limitata. Va però rilevato un effetto collaterale severo della terapia con ciclodestrine che è l'ototossicità, apparentemente dose-dipendente. Arimoclomol, infine, è una piccola molecola in gra-

L'unica terapia specifica approvata per il trattamento dei sintomi neurologici è miglustat; oggi sono in studio nuovi farmaci

do di attraversare la barriera emato-encefalica, che può essere somministrata per via orale. Il suo meccanismo d'azione si basa sull'attivazione del sistema delle "heat shock proteins" cellulari, potenzialmente coinvolte nel mantenimento di un corretto ripiegamento proteico e nella promozione della funzionalità lisosomiale. Arimoclomol è attualmente in fase di sperimentazione in una coorte di pazienti affetti dalla forma giovanile della malattia.

Bibliografia

- Patterson MC, Hendriksz CJ, Walterfang M, et al. NP-C Guidelines Working Group. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol Genet Metab.* 2012 Jul;106(3):330-44.
- Hendriksz CJ, Pineda M, Fahey M, et al. The Niemann-Pick Disease Type C Suspicion Index: Development of a New Tool to Aid Diagnosis. *Journal of Rare Disorders: Diagnosis & Therapy.* 2015 Vol. 1 No. 1:11.
- Santos-Lozano A, Villamandos García D, Sanchis-Gomar F, et al. Niemann-Pick disease treatment: a systematic review of clinical trials. *Ann Transl Med.* 2015 Dec;3(22):360

I quadri clinici atipici nelle forme giovanili e adulte

Michelangelo Mancuso, Costanza Simoncini Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Clinica Neurologica, Università di Pisa

La Niemann Pick di tipo C è una malattia assai eterogenea, che presenta una importante variabilità in termini di:

- combinazione di sintomi viscerali, neurologici e psichiatrici
- età all'esordio dei segni neurologici
- progressione della malattia
- outcome di malattia.

Dal punto di vista genetico, la Malattia di Niemann-Pick tipo C (NPC) è una patologia a trasmissione autosomica recessiva, che quindi si manifesta solo nei soggetti omozigoti o eterozigoti composti per mutazioni patogenetiche presenti in uno dei due geni cau-

Anche la condizione di eterozigosi potrebbe determinare quadri neurodegenerativi

Tab. 1 Pazienti con quadri atipici di NPC

	GENOTIPO	FENOTIPO
Godeiro-Junior C et al, Movement Disorders 2006	Mutazione composta in eterozigosi (P1007A and F1221fsX20) NPC1	PSP-like
Josephs KA, Neurology 2004	Mutazione 2974G→C (Gli992Arg)	Tremore essenziale
Harzer K et al, Journal of Inherited Metabolic Disease 2013	Madre e figlia eterozigoti p.I1061T (c.3182T>C) NPC1	Figlia con splenomegalia infantile isolata, cellule schiumose nel midollo osseo. Madre con cellule schiumose nel midollo osseo e nessuna storia di splenomegalia
Cupidi C et al, Journal of Alzheimer Disease 2017	1. delezione eterozigote c.852delT (p.F284LfsX26) NPC1 2. eterozigote c.441+1G>A NPC2 3. eterozigote mutazione c.665A>G (p.N222S) NPC1 4. eterozigote c.88G>A (p.V30M) NPC2	1. PSP like 2. CBD 3. CBD 4. CBD
Bauer P et al, Human Molecular Genetics 2013	12 pazienti con singoli alleli NPC mutanti (8 con mutazione NPC1 e 3 con mutazione NPC2) o con mutazione causale nota e variante dell'allele NPC1 non classificata (1 paziente)	Diverse manifestazioni neuropsichiatriche
Cuisset J-M et al, Journal of Medical Case Reports 2016	Mutazioni I1061T/R934X NPC1 composite in eterozigosi	Disturbi del comportamento e difficoltà di apprendimento a esordio precoce (5 anni), crisi epilettiche; in seguito, tipico fenotipo NPC
Zech M et al, Plos One 2013	Mutazione in eterozigosi in NPC1 (5 pazienti), 1 paziente NPC2 in eterozigosi (c.88G.A p.Val30Met)	Parkinson (in alcuni casi con tratti atipici come compromissione dello sguardo verticale o allucinazioni a esordio precoce)
Jecel J et al, Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening 2015	Eterozigosi p.N916del NPC1, variante del fenotipo biochimico. Madre con la stessa mutazione	Fenotipo NPC tipico. Madre con la stessa mutazione, con leucoencefalopatia, paralisi dello sguardo verticale, atassia, declino cognitivo

PSP: paralisi sopranucleare progressiva
CBD: sindrome cortico basale



sativi (NPC1 o NPC2). Tuttavia, modelli animali hanno dimostrato che anche la condizione di **eterozigosi favorisce la neurodegenerazione**.

Inoltre, in letteratura sono stati riportati casi clinici di portatori di mutazioni in eterozigosi con clinica suggestiva per NPC (Tab. 1), sollevando l'ipotesi di un **possibile ruolo patogenetico di tale assetto genetico**, sia come fattore causativo che come fattore di rischio di patologia neurodegenerativa.

Altro punto rilevante, ottenuto da un'attenta revisione della letteratura, è il riscontro di casi con **presentazione di malattia atipica** (quali forme SM-like, Paralisi Sopranucleare Progressiva -like, disturbi psicotici-comportamentali), quest'ultimo dato dovrebbe rappresentare un "campanello di allarme" per i medici in generale e per i neurologi in particolare,

Sulla base del riscontro in letteratura di casi con presentazione di malattia atipica, si potrebbe estendere lo screening per NPC a più pazienti

per cui si potrebbe proporre di **estendere lo screening** per NPC ad una casistica di pazienti più ampia rispetto a quella studiata fino ad ora.

E' verosimile ipotizzare che le nuove tecnologie di screening genetico tramite pannelli porteranno all'identificazione di sempre più pazienti NPC, anche eterozigoti, con fenotipo tipico o atipico.

Obiettivo della ricerca scientifica sarà poi quello di caratterizzare meglio il fenotipo NPC delle forme giovanili e adulte ed il reale ruolo patogenetico delle mutazioni NPC1 e/o NPC2 in eterozigosi.

Screening in pazienti con problemi di movimento e decadimento cognitivo

Marina Picillo Centro per le Malattie Neurodegenerative (CEMAND), Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Sezione Neuroscienze, Università di Salerno

Numerose evidenze suggeriscono che disordini del movimento e demenza con disturbi comportamentali rappresentano i due estremi di un continuum di malattie neurologiche a frequente eziologia genetica.

Recenti dati sulla caratterizzazione delle forme di malattia di Niemann-Pick di tipo C (NPC) ad esordio in età adulta e dei quadri in eterozigosi suggeriscono che la NPC deve essere considerata nella **diagnosi differenziale di questo spettro di disordini**.

Un recente studio ha dimostrato la presenza di quattro eterozigoti NPC1/NPC2 tra 50 casi di demenza plus.

Tali pazienti presentavano diagnosi di Paralisi Sopranucleare Progressiva (PSP) e Sindrome Corticobasale (CBS), malattie neurologiche di fatto classificate tra i disordini del movimento (es. parkinsonismi atipici).¹ (Tab. 1)

Dati preliminari mostrano che attraverso uno *screening* sistematico di 37 casi con parkinsonismo atipico (35 PSP/2 CBS)

In corso uno screening con un pannello di geni associati a parkinsonismo e demenza in pazienti con disturbi del movimento o demenza con/senza disturbi comportamentali e familiarità per malattie neurologiche

presso il nostro centro, abbiamo riscontrato 3 casi di pazienti PSP portatori di mutazioni eterozigoti NPC1/

Tab. 1 Pazienti con mutazioni dei geni NPC nello screening su 50 pazienti affetti da demenza plus

	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
VSGP	Sì	Sì	Sì	Sì
Atassia	Sì	No	No	Sì
Distonia	Sì	Sì	Sì	Sì
Parkinsonismo	Sì	Sì	No	Sì
Mioclono	No	Sì	No	Sì
Diagnosi clinica	PSP	CBS	CBS	CBS
Mutazione	NPC1: p. F284LfsX26	NPC2: c. 441+1G>A	NPC2: p. N222 S	NPC2: p. V30M
Storia familiare	Sì	Sì	Sì	No

PSP: Paralisi sopranucleare progressiva; CBS: Sindrome corticobasale

Tab. 2 Pazienti con mutazioni dei geni NPC nello screening su 37 pazienti affetti da parkinsonismo atipico (35 PSP/2 CBS)

	CASO 1	CASO 2	CASO 3
VSGP	Sì	Sì	Sì
Demenza	Sì	Sì	Sì
Atassia	No	No	No
Distonia	Sì	Sì	Sì
Parkinsonismo	Sì	Sì	Sì
Mioclono	No	No	No
Diagnosi clinica	PSP	PSP	PSP
Mutazione	NPC2: V30M (nota)	NPC1: D531H (nuova)	NPC1: F68L (nota)
Storia familiare	Sì	Sì	Sì

Lo stato eterozigote NPC1/NPC2 era presente nell'85% dei casi di PSP; PSP: Paralisi sopranucleare progressiva; CBS: Sindrome corticobasale



NPC2 (8,5%). Il fenotipo clinico era sovrapponibile agli altri casi di PSP (Tab. 2).

Non è stato possibile procedere con ulteriori accertamenti per verificare l'impatto funzionale delle mutazioni in eterozigosi (dosaggio plasmatico degli ossisteroli o Filipin test su biopsia di cute).

Rimane pertanto non chiaro se le mutazioni riscontrate in eterozigosi possano avere un ruolo nel determinare un **fenotipo clinico compatibile con diagnosi di PSP nell'adulto**.

E' attualmente in corso uno *screening* con un pannello di geni associati a parkinsonismo e demenza

Resta da chiarire se mutazioni NPC1/NPC2 in eterozigosi determinino un fenotipo clinico compatibile con la diagnosi di PSP

e rivolto a pazienti con disordini del movimento e demenza, con e senza disturbi comportamentali e familiarità per malattie neurologiche. Tale pannello contiene anche i geni NPC1 ed NPC2.

I soggetti identificati come portatori di mutazioni eterozigoti effettueranno indagini funzionali per valutare l'impatto di tali mutazioni sul metabolismo del colesterolo.

Bibliografia

- Cupidi C, Frangipane F, Gallo M, et al. Role of Niemann-Pick Type C Disease Mutations in Dementia. *J Alzheimers Dis.* 2017;55(3):1249-1259.

Pazienti «Huntington like»: un nuovo fenotipo per la malattia di Niemann Pick di tipo C?

Lorenzo Nanetti SOSD Genetica delle Malattie Neurodegenerative e Metaboliche, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

La malattia di Huntington (MH) è una malattia neurodegenerativa genetica a trasmissione autosomica dominante causata dall'espansione anomala di triplette CAG (>35) nel gene IT5.

La MH esordisce nella maggior parte dei pazienti in età adulta ed è clinicamente caratterizzata da alterazione dei movimenti oculari, discinesie (ipercinesie, distonia), disequilibrio nel cammino, decadimento cognitivo e alterazioni comportamentali.

Il test genetico permette di identificare i pazienti portatori della mutazione patogena per MH, ma, nel caso il test genetico risulti negativo, bisogna considerare altre diagnosi differenziali. Esistono, infatti, malattie neurologiche caratterizzate da un fenotipo simile alla MH, quali le atassie spinocerebellari, le neuroferitinopatie e la malattia prionica geneticamente determinata.

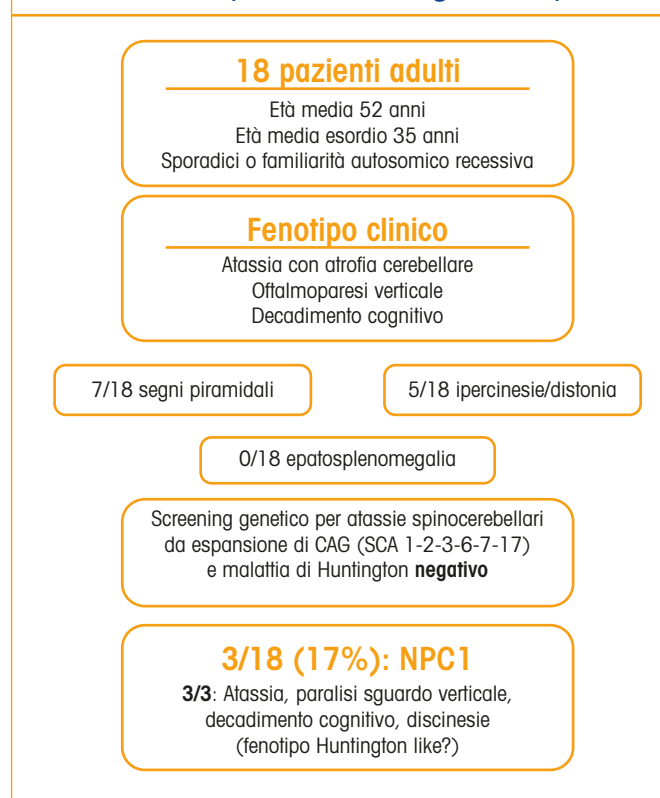
La malattia di Niemann Pick di tipo C (NPC) ad esordio adulto potrebbe essere considerata **fra le diagnosi differenziali della MH**, in quanto caratterizzata da atassia, alterazioni dei movimenti oculari verticali, decadimento cognitivo, discinesie e alterazioni del comportamento.

In 18 pazienti ad esordio adulto con fenotipo simile alla MH è stata eseguita l'analisi genetica per NPC, previa selezione in base a tali criteri: storia familiare negativa o compatibile con trasmissione autosomica recessiva, fenotipo clinico caratterizzato da atassia cerebellare, paralisi di sguardo verticale e decadimento cognitivo. 3/18 (17%) sono stati diagnosticati come NPC (1 paziente omozigote e 2 pazienti eterozigoti composti per differenti mutazioni nel gene

NPC1) (Tab. 1). Tale percentuale diagnostica è paragonabile a quella di un precedente studio di pazienti adulti con caratteristiche cliniche simili (Schicks *et al.* 2013). I tre pazienti NPC oltre ai deficit neurologici già descritti, presentavano anche segni piramidali e

La NPC ad esordio adulto potrebbe essere considerata tra le diagnosi differenziali della Malattia di Huntington

Tab. 1 Pazienti con sintomi Huntington-like sottoposti ad analisi genetica per NPC





Tab. 2 Caratteristiche dei pazienti diagnosticati

PAZIENTE	MUTAZIONI NEL GENE NPC1	ETÀ DI ESORDIO	ETÀ ALLA VISITA	ATASSIA SARA SCORE	MOE	DECADIMENTO COGNITIVO	ALTERAZIONI COMPORTAMENTO	ALTRE CARATTERISTICHE
1	c.3493G>A	35	56	moderata 15/40	paralisi verticale	lieve	aggressività, irritabilità, inattenzione	ipercinesie, distonia arti
2	c.57G>A c.1133T>C	38	57	lieve 8/40	paralisi verticale	lieve	ripetitività, inattenzione	Babinski, ipercinesie, maculopatia, cataratta
3	c.1654+6delTAAGAG exons 6-9 deletion	39	55	marcata 33/40	paralisi verticale e orizzontale	marcato	ripetitività, inattenzione, aggressività	Babinski, distonia arti

Tab. 3 Storia clinica e terapeutica dei pazienti trattati

PAZIENTE 1	PAZIENTE 2
35 anni: esordio con atassia	10 anni: maculopatia (visus 2/10)
42 anni: maculopatia con ipovisus	38 anni: esordio dei sintomi atassici
49 anni: utilizzo deambulatore dopo 14 anni esordio	41 anni: cataratta bilaterale
51 anni: neoplasia mammaria	
	chitotriosidasi 156 nmoli/h/ml (v.n. 0.1-54)
EMG-ENG nella norma	ecografia addome nella norma
trattamento con mirtazapina ed escitalopram per umore depresso	EMG-ENG nella norma
	trattamento con paroxetina e quietapina per umore depresso e disturbo ossessivo/paranoideo

discinesie motorie (ipercinesie/distonia), in assenza di epato o splenomegalia (Tab. 2). 2/3 pazienti sono stati trattati con miglustat per 24 mesi con lieve peggioramento della sintomatologia atassica (Tab. 3).

Sintomi chiave sono atassia, alterazioni dei movimenti oculari verticali, decadimento cognitivo, discinesie, alterazioni comportamentali

Ruolo dell'imaging neurologico nell'indagine diagnostica e nel follow up terapeutico

Serena D'Agostini Neuroradiologia, Ospedale Accademico S.M. della Misericordia, Udine

Le tecniche più avanzate di studio neuroradiologico con Risonanza Magnetica (RM) nella malattia di Niemann Pick tipo C (NPC) consentono di individuare meglio e comprendere i meccanismi che sono alla base del danno neurologico.

In particolare, la **Diffusion Tensor Imaging** (DTI) fornisce informazioni sul livello di organizzazione anatomica di un distretto encefalico e la spettroscopia misura in vivo la presenza di metaboliti indicatori dello stato di integrità del tessuto cerebrale.

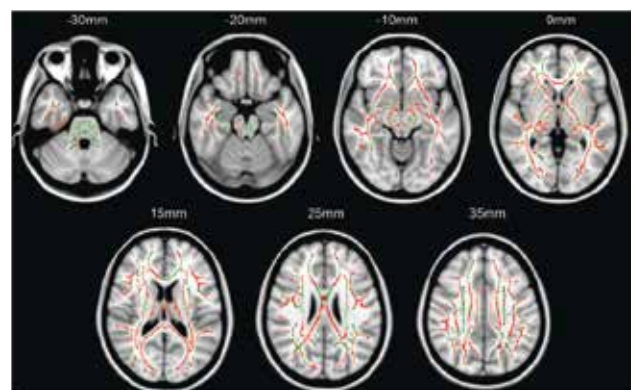
Particolare interesse suscita anche l'analisi volumetrica del corpo calloso, quale indicatore del livello di progressione di malattia, per lo più nella popolazione pediatrica e giovanile.

Recenti studi sembrano poter correlare il grado di severità della malattia di NPC con la Fractional Anisotropy (FA), misurata tramite DTI in corrispondenza della sostanza bianca dei principali fasci nervosi (Fig. 1). In base a questi dati si ipotizza in futuro di poter utilizzare i parametri DTI quali biomarker di evoluzione di malattia e di risposta alla terapia farmacologica (Fig. 2).

Per quanto riguarda la spettroscopia cerebrale *in vivo*, l'esame può fornire dati sulle variazioni del profilo spettrale di determinate aree anatomiche del cervello in casi avanzati, ma al momento non ci sono

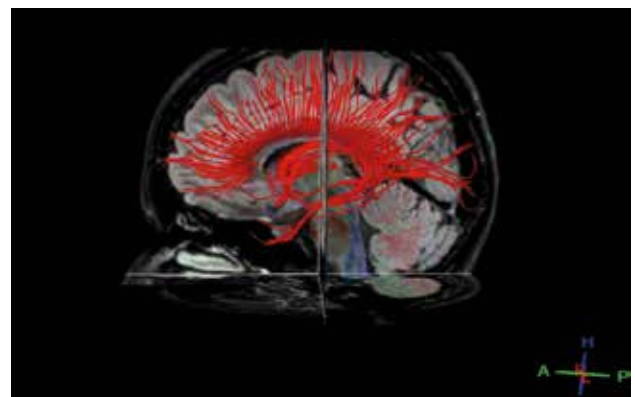
dati a supporto di una sua reale utilità nel monitoraggio del decorso di malattia. Nella pratica clinica va, inoltre, tenuto conto anche della difficoltà tecnica di esecuzione dello studio, che prolunga in maniera significativa la durata dell'esame RM e richiede l'asso-

Fig. 1 Alterazioni dell'anisotropia frazionaria della materia bianca



Walterfang M et al, Neurology 2010; 75: 49-56

Fig. 2 Immagine DTI



Ad oggi lo studio neuroradiologico è parte integrante di diagnosi ed inquadramento ma non è ancora utilizzato per impostare l'iter terapeutico



Moderne tecniche di studio come la Diffusion Tensor Imaging potrebbero in futuro aiutare a definire outcome e risposta alla terapia

luta immobilità del paziente, con necessità pertanto in alcuni casi di sedazione profonda.

In conclusione, riteniamo che lo studio neuroradiologico sia parte del percorso di diagnosi e inquadra-

mento di malattia, ma allo stato attuale non può ancora essere utilizzato al fine di indirizzare l'iter terapeutico.

Le moderne tecniche di studio sembrano avere maggior utilità nella comprensione della fisiopatologia della malattia, nell'individuare i sistemi e i circuiti funzionali interessati ed il loro progressivo coinvolgimento.

Bibliografia

- Walterfang M, Fahey M, Desmond P, et al. White and gray matter alterations in adults with Niemann-Pick disease type C A cross-sectional study. *Neurology*. 2010 Jul 6;75(1):49-56. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e6210e. Epub 2010 May 19.
- Walterfang M, Fahey M, Abel L et al. Size and Shape of the Corpus Callosum in Adult Niemann-Pick Type C Reflects State and Trait Illness Variables. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011 Aug;32(7):1340-6. doi: 10.3174/ajnr.A2490. Epub 2011 May 19.
- Huang JY, Peng SF, Yang CC et al. Neuroimaging findings in a brain with Niemann-Pick type C disease. *J Formos Med Assoc*. 2011 Aug;110(8):537-42.
- Galanaud D, Tourbah A, Lehericy S, et al. 24 month-treatment with miglustat of three patients with Niemann-Pick disease type C: follow up using brain spectroscopy. *Mol Genet Metab*. 2009 Feb;96(2):55-8. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.10.002. Epub 2008 Nov 13.
- Masingue M, Adanyeguh I, Nadjar Y, et al. Evolution of structural neuroimaging biomarkers in a series of adult patients with Niemann-Pick Type C under treatment. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 Feb 2;12(1):22. doi: 10.1186/s13023-017-0579-3.

EyeSeeCam: la video-oculografia nella diagnosi e nel follow up terapeutico

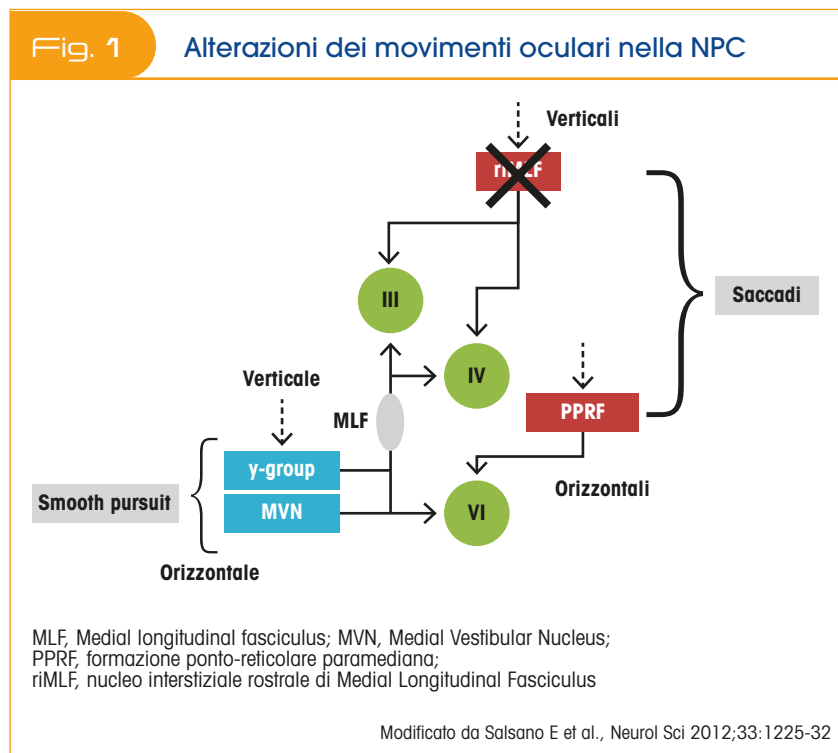
Ettore Salsano Istituto Neurologico C. Besta, Milano

La malattia di Niemann-Pick di tipo C (NPC) è caratterizzata, fra l'altro, da una significativa alterazione sopranucleare della motilità oculare.

In particolare, nella NPC vi è una elettiva e precoce degenerazione dei neuroni del nucleo rostrale interstiziale del fascicolo longitudinale mediale (riMLF) che determina una progressiva compromissione delle saccadi verticali, seguita da una degenerazione

dei neuroni della formazione reticolare pontina paramediana (FRPP), che determina invece una compromissione delle saccadi orizzontali. L'EyeSeeCam è un video-oculografo portatile che permette, attraverso un protocollo sviluppato *ad hoc*, la registrazione quantitativa e non invasiva di una serie di parametri dei movimenti oculari che sono usualmente alterati nella NPC (Fig. 1).

EyeSeeCam registra una serie di parametri dei movimenti oculari alterati nella NPC



Il protocollo include prove per la registrazione dei parametri di saccadi riflesse verticali ed orizzontali, saccadi *self-paced* verticali e orizzontali, pursuit verticali e orizzontali e fissazione (*gaze holding*). La calibrazione del dispositivo è eseguita tramite i *pursuit* o tramite il riflesso vestibulo-oculare (VOR).

Dati preliminari documentano:

- 1) la capacità del video-oculografo EyeSeeCam di rilevare il rallentamento della velocità di picco (*peak velocity*) delle saccadi, specie nelle fasi precoci di malattia (Tab. 1, parte superiore);
- 2) una buona replicabilità dei risultati intra-soggetto (Tab. 1, parte inferiore). Tali dati preliminari incoraggiano l'impiego della metodica per diversi scopi:
 - 1) in **fase diagnostica** per rilevare anomalie oculomotorie a supporto dell'ipotesi di NPC;
 - 2) in **familiari pre-sintomatici di pazienti**



Tab. 1 Valori della velocità di picco in una piccola coorte di pazienti NPC adulti registrati mediante video-oculografo EyeSeeCam

Nella parte superiore sono indicati i valori della velocità di picco delle saccadi verticali. Si noti come in 2 pazienti (MI2 e MI3), la cui storia di malattia è relativamente lunga, non siano state registrate né saccadi verso l'alto né verso il basso. Nei medesimi pazienti, invece, è stato possibile registrare la velocità di picco delle saccadi orizzontali (parte inferiore), in accordo con il fatto che la compromissione delle saccadi orizzontali sia più tardiva rispetto a quella delle saccadi verticali. Tale velocità risulta ai limiti inferiori di norma o più bassa della norma e il re-test suggerisce una buona replicabilità. Abbreviazioni: het = eterozigote; nv = valori normali (Bonnet C et al., 2013).

Pz #	V_{max} (°/s) Up (+10° o +20°) [nv=402 (±109)]	V_{max} (°/s) Down (-10° o -20°) [nv=491 (±120)]
I-MI1-NPC	103(±51)	-115 (±68) (-10°)
I-MI2-NPC	NaN (Not a Number)	NaN
I-MI3-NPC	NaN	NaN
I-MI4-NPC	304 (±84)	NaN
NPC-het	362 (±55)	-454 (±43)
Pz #	V_{max} (°/s) Right (+15° o +20°) [nv=500 (±106)]	V_{max} (°/s) Left (-15° o -20°) [nv=473 (±101)]
IT-MI1-NPC	252 (±51)	-273 (±56)
IT-MI2-NPC	297 (±19)	-301 (±39)
IT-MI2-NPC Re-test	293 (±31)	-298 (±30)
IT-MI3-NPC	265 (±27)	-284 (±20)
IT-MI3-NPC Re-test	286 (±44)	-257 (±21)
IT-MI4-NPC	414 (±33)	-426 (±73)
IT-MI4-NPC Re-test	415 (±51)	-410 (±35)
NPC-het	363 (±61)	-400 (±28)

Bonnet C et al, 2013;124:2216-29

ti con NPC per rilevare anomalie subcliniche della motilità oculare che possano giustificare l'inizio di una terapia specifica;

3) come **biomarcatore** per valutare la progressione di malattia;

4) per **stratificare ogni paziente** in base al proprio grado di progressione, ovvero al grado di variazione quantitativa dei parametri dei movimenti oculari in un intervallo di tempo precedente l'inizio di una eventuale terapia.

Nuovi biomarker neurofisiologici per la malattia di NPC

Alberto Benussi, Alessandro Padovani, Barbara Borroni Unità di Neurologia, Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali, Università di Brescia

La malattia di Niemann-Pick di tipo C (NPC) è un rara patologia da accumulo lisosomiale a trasmissione autosomica recessiva, che si manifesta clinicamente con un vasto spettro di segni e sintomi neurologici.

Lo stato, la progressione della patologia ed un'eventuale risposta alla terapia vengono valutati clinicamente, in assenza di biomarcatori oggettivi.

In questo studio, abbiamo valutato diverse misure neurofisiologiche al fine di **identificare un biomarcatore specifico** per la patologia e allo stesso tempo sensibile alla progressione della malattia, anche nelle fasi precliniche.

Tramite l'utilizzo della stimolazione magnetica transcranica abbiamo indagato alcune misure di con-

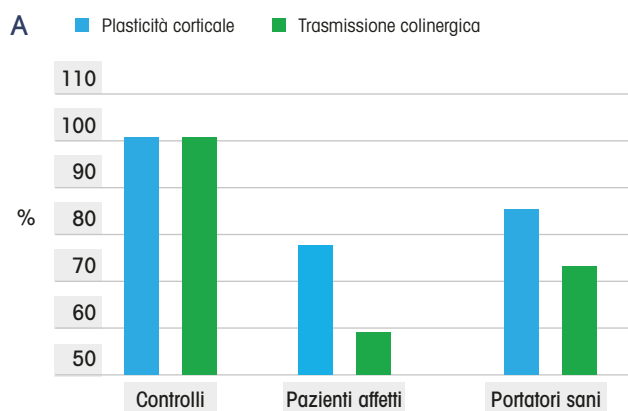
nettività corticale dipendenti dalla trasmissione GABAA, GABAB, glutamatergica e colinergica, e la plasticità corticale a lungo termine, in due pazienti affetti da NPC e in due familiari, portatori sani della mutazione in eterozigosi.

Abbiamo evidenziato **un'alterazione della plasticità corticale e della trasmissione colinergica** nei pazienti affetti da NPC, che correlava con il grado di compromissione cognitiva e motoria.

Anche nei portatori sani in eterozigosi, abbiamo iden-

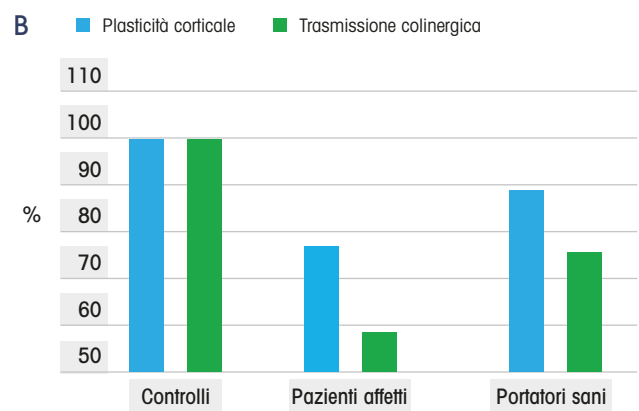
In assenza di biomarcatori oggettivi, la valutazione della NPC è clinica, basata sull'ampio spettro di segni e sintomi neurologici

Fig. 1 Plasticità corticale e attività colinergica cerebrale nei pazienti affetti e nei portatori sani



Plasticità corticale e attività colinergica cerebrale, espresse come percentuale dell'attività registrata in un gruppo di controlli sani, nei pazienti affetti da malattia di Niemann-Pick di tipo C (2 gemelli omozigoti per mutazione NPC1) e nei portatori sani (2 soggetti eterozigoti per mutazione NPC1)

Miglioramento dei parametri neurofisiologici dopo terapia con miglustat



Modulazione della plasticità corticale e dell'attività colinergica cerebrale dopo 12 mesi di trattamento con miglustat in entrambi i pazienti affetti, con un notevole miglioramento di entrambi i parametri.



tificato delle moderate, seppur minori, alterazioni della plasticità corticale e della trasmissione colinergica cerebrale (Fig. 1).

In particolare, in una portatrice affetta da sindrome extrapiramidale tremorigena, i valori di plasticità e di attività colinergica sono risultati simili a quelli dei pazienti affetti. Infatti, in questa paziente, il test di Filipin ha evidenziato un accumulo di colesterolo non esterificato compatibile con un "fenotipo variante".

Dopo 12 mesi di trattamento con miglustat, abbiamo osservato un notevole miglioramento dei parametri

I biomarcatori GABAA e GABAB potrebbero contribuire alla diagnosi e dare indicazioni sulla risposta alla terapia con miglustat e sulla progressione della NPC

di plasticità corticale e di trasmissione colinergica in entrambi i pazienti con NPC.

In conclusione, questi biomarcatori potrebbero contribuire a confermare la diagnosi di NPC, fornendo inoltre un'indicazione sulla risposta alla terapia e sulla progressione della malattia.

Bibliografia

- Benussi A, Cotelli MS, Cosseddu M et al. Preliminary Results on Long-Term Potentiation-Like Cortical Plasticity and Cholinergic Dysfunction After Miglustat Treatment in Niemann-Pick Disease Type C. *JIMD Rep.* 2017 Jan 17. doi: 10.1007/8904_2016_33. (Epub ahead of print)

Il processo diagnostico e i casi non risolti: veri eterozigoti o limiti tecnici?

Andrea Dardis Laboratorio Centro di Coordinamento Regionale Malattie Rare, Ospedale Accademico SM della Misericordia di Udine

La malattia di Niemann Pick C (NPC) è causata da mutazioni nei geni NPC1 o NPC2 che codificano per due proteine coinvolte nel traffico intracellulare di colesterolo. Questo disordine è caratterizzato dall'accumulo di colesterolo non esterificato all'interno dei lisosomi. Per questo motivo, il test elettivo per la diagnosi biochimica di NPC prevede la dimostrazione diretta della compromissione del trasporto intracellulare di colesterolo non-esterificato in fibroblasti in coltura mediante la colorazione con Filipin. L'analisi al microscopio a fluorescenza di cellule ottenute da pazienti NPC dopo marcatura con Filipin dimostra la presenza *in situ* di numerose vescicole perinucleari molto fluorescenti (perché infarcite di colesterolo non esterificato).

Questo quadro si presenta nell'80-85% dei casi e rappresenta la forma biochimica classica della malattia, mentre il restante 15-20% dei casi presenta un fenotipo biochimico "variante" caratterizzato da un minor accumulo di colesterolo non esterificato.

La diagnosi biochimica viene poi confermata dallo studio molecolare dei geni NPC1 ed NPC2.

Nonostante il Filipin test sia stato considerato per anni il test di primo livello per la diagnosi di NPC, presenta **numerose criticità** in quanto richiede l'allestimento di colture primarie di fibroblasti cutanei dai pazienti, viene eseguito solo in appositi centri dotati di perso-

nale idoneo ed addestrato alla valutazione dei preparati ed in alcuni casi i risultati non sono conclusivi. Queste difficoltà diagnostiche hanno favorito la ricerca di biomarcatori misurabili mediante metodi più semplici, non invasivi, poco costosi ed ad alta processività che potessero essere utilizzati per un primo screening della malattia.

Ad oggi sono stati condotti o sono in via di sviluppo studi riguardanti **diversi marcatori**, tra questi i più ampiamente utilizzati sono i prodotti di ossidazione non enzimatica del colesterolo, in particolare, il 7-chetocolesterolo (7-KC) e il colestano-3 β ,5 α ,6 β -triolo (triolo), genericamente definiti ossisteroli, che risultano significativamente aumentati nel plasma dei soggetti NPC rispetto a controlli sani. Il dosaggio degli ossisteroli mediante spettrometria di massa ha un'adeguata processività ed elevate sensibilità e specificità.

Tuttavia, questi metaboliti risultano elevati anche in pazienti affetti da deficit di sfingomielinasi, xantomatosi cerebrotendinea e deficit di lipasi acida, inoltre circa un 3% di pazienti affetti da NPC presentano valori che rientrano nella norma e si osserva una sovrapposizione molto significativa fra individui portatori di mutazioni in NPC1 o NPC2 ed individui malati o sani.

Quindi, nonostante il dosaggio di ossisteroli abbia sostituito il Filipin test come primo *step* nel processo diagnostico della malattia di NPC, esso rappresenta un metodo di *screening* ed i risultati devono essere sempre confermati mediante l'analisi molecolare dei geni NPC1 e NPC2. Nella maggior parte dei pazienti che presentano valori elevati di ossisteroli

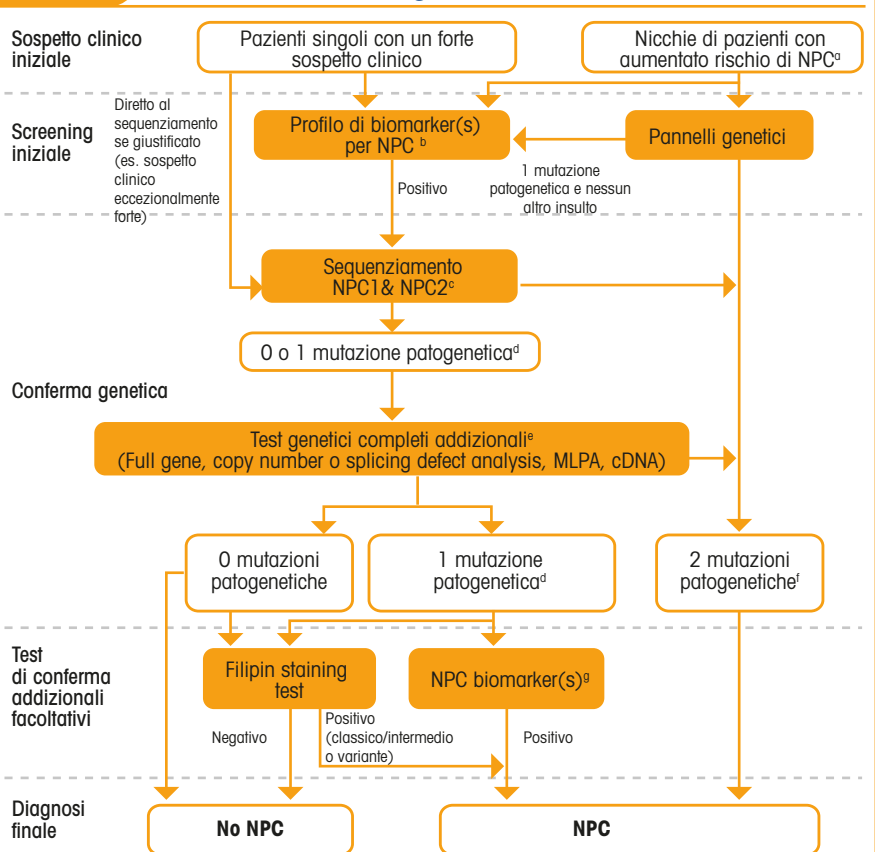
Malgrado i progressi in campo biochimico e molecolare, il Filipin test è l'unico strumento per determinare la patogenicità delle varianti di significato non noto



Recenti programmi di screening hanno messo in evidenza l'ipotetico ruolo svolto dalle mutazioni monoalleliche nei geni NPC1 e NPC2 nello sviluppo di sintomi neurologici

plasmatici, il sequenziamento della zona codificante dei geni NPC1 e NPC2 porta all'**identificazione di mutazioni patogenetiche** e quindi, dopo aver verificato la segregazione degli alleli nei genitori, alla **conferma diagnostica**. Tuttavia, in alcuni casi, il sequenziamento della zona codificante dei geni porta all'identificazione di una sola mutazione patogenetica associata o meno ad una variante di significato non noto. In questi casi, risulta indispensabile eseguire degli **studi molecolari complementari** come l'analisi del numero di copie del gene NPC1 e NPC2 mediante *multiplex ligation-probe amplification* (MLPA) ed analisi dell'mRNA per individuare delle mutazioni in sequenze introniche profonde che portano a difetti di *splicing*. Di fatto, il Filipin test rimane l'unico strumento disponibile per determinare la patogenicità delle varianti

Fig. 1 Algoritmo diagnostico rivisto per utilizzo di biomarker e test genetico



I singoli passaggi possono essere omessi se non disponibili localmente. a) le popolazioni di pazienti a rischio sono definite in Patterson et al, tabella 1; b) biomarker negativi possono essere indicativi che la diagnosi non è NPC; c) sequenziamento single-gene (esoni o mutazioni note) o altro; d) + 1 VUS facoltativo; e) Riguarda il deep intronic sequencing e se possibile le regioni regolatorie della trascrizione del gene; f) 2 diversi alleli; g) profilo di biomarker(s) (se non condotto inizialmente), o profilo di biomarker esteso (in aggiunta a quello già eseguito). Nota: malgrado le indagini complete, potrebbe non essere possibile confermare definitivamente una diagnosi di NPC in alcuni pazienti. In questi casi, si possono considerare una rivalutazione approfondita dei dati clinici longitudinali, analisi genomiche più approfondite (per esempio, intero esoma e sequenziamento intero del genoma) e valutazioni biologiche delle cellule. cDNA = DNA complementare. MLPA = multiplex ligation-dependent probe amplification.

Patterson MC et al. Neurology®: Clinical Practice Pubblicato online October 24, 2017
doi: <http://dx.doi.org/10.1212/CPJ.000000000000399>.
Neurol Clin Pract 10.1212/CPJ.000000000000399

di significato non noto e risulta essenziale per accertare la diagnosi in pazienti nei quali anche dopo un'esaustiva analisi molecolare sono state identificate una o due varianti di significato non noto.

Nella [Figura 1](#) si presenta uno schema semplificato dell'algoritmo diagnostico utilizzato nel nostro laboratorio per la diagnosi di NPC. Negli ultimi anni, la **disponibilità di biomarcatori e lo sviluppo di metodi di sequenziamento massivo** hanno favorito l'avvio di diversi programmi di *screening* della malattia di NPC in gruppi selezionati di pazienti all'interno dei quali sono stati identificati una serie di soggetti con valori di ossisteroli elevati o normali e una sola mutazione patogenetica, o di significato non noto, nei geni NPC1 o NPC2. Questi dati hanno portato a ipotizzare che la presenza di mutazioni in un solo allele in questi geni potrebbe essere responsabile o rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza di sintomi neurologici. Questi dati devono tuttavia essere interpretati con cautela e risulta indispensabile approfondire le indagini molecolari per escludere la presenza di variazioni del numero di copie dei geni e mutazioni introniche profonde.

Anche se nella nostra esperienza, questa strategia di analisi molecolare consente l'identificazione dei due alleli NPC in circa il 98% dei casi, la presenza di una seconda mutazione nelle sequenze regolatorie dei geni o non identificata per limiti tecnici, non può essere esclusa completamente.

In pazienti con una sola mutazione identificata, anche dopo un'esaustiva analisi molecolare dei geni NPC1 e NPC2, un fenotipo classico al Filipin test suggerisce fortemente la diagnosi di NPC, mentre l'assenza di accumulo indica molto probabilmente una condizione di portatore

In questi casi, l'analisi dell'accumulo intracellulare di colesterolo mediante colorazione di Filipin può essere molto utile in quanto la presenza di un fenotipo biochimico classico (con accumulo massivo di colesterolo non esterificato), suggerisce fortemente che il paziente è affetto da NPC e che la seconda mutazione non è stata identificata per uno dei motivi sopra elencati, mentre l'assenza di accumulo di colesterolo non esterificato suggerisce fortemente che si tratti di un individuo portatore di NPC.

Rimane invece di difficile interpretazione la presenza di accumulo più debole di colesterolo non esterificato in quanto questo risultato può essere ottenuto in pazienti affetti da NPC con fenotipo biochimico variante o in individui portatori. In conclusione, nonostante i progressi compiuti negli ultimi anni sia in ambito biochimico sia molecolare, la diagnosi della malattia di NPC rimane complessa e quindi richiede oltre che una **stretta collaborazione** fra clinici e laboratori, una valutazione complessiva dei risultati di laboratorio.



I quadri di eterozigosi: problematiche aperte

Identificate quattro nuove mutazioni in eterozigosi in pazienti con demenza plus

Lo screening per i geni NPC1 e NPC2 in 50 pazienti affetti da demenza plus ha identificato 4 diverse mutazioni in eterozigosi: la delezione F284LfsX26 di NPC1 in una donna di 68 anni affetta da paralisi sopranucleare progressiva, la mutazione intronica c.441+1G>A di NPC2 in un uomo di 70 anni, la mutazione N222S di NPC1 in una donna di 62 anni e la mutazione V30M di NPC2 in una donna di 52 anni, tutti affetti da sindrome corticobasale. I pazienti presentano un quadro clinico simile, con demenza frontale associata a parkinsonismo, e il loro NPC Suspicion Index (score >40) rende probabile la diagnosi di NPC. Il Filipin test

è risultato positivo con fenotipo biochimico variante, nei primi due pazienti.

Spunti di discussione: è possibile che l'eterozigosi abbia indotto un'alterazione del metabolismo lipidico ed un fenotipo con esordio nell'età adulta a lenta evoluzione? Nelle pazienti con Filipin negativo, è possibile che l'eterozigosi abbia rappresentato un fattore di rischio per malattie neurodegenerative?

Chiara Cupidi

Centro Regionale di Neurogenetica, ASP Catanzaro,
Lamezia Terme

Il ruolo della mutazione A1187V in eterozigosi in una famiglia con disturbi neurologici

Si presenta una famiglia, originaria della provincia di Vicenza, senza riferite unioni tra consanguinei, dove 4 fratelli maschi hanno manifestato a partire dai 25-30 anni disturbi neurologici tra loro simili caratterizzati da modificazioni comportamentali/psicosi, parasonnie, sogni vividi e crisi epilettiche.

Successivamente hanno sviluppato in progressione atassia nella marcia, tremori con scosse miocloniche ai 4 arti, alterazioni della motilità oculare e progressivo deterioramento cognitivo. Si è giunti ad exitus, per complicanze legate a grave disfagia, in 2 fratelli su 4, dopo circa 10 anni dall'esordio di malattia.

L'analisi molecolare del gene NPC1 ha permesso di dimostrare due mutazioni in eterozigosi: A1187 nei 4 fratelli e N222 in 2/4,

entrambe descritte come patogenetiche per NPC1. Da ultimo è stato eseguito anche il Filipin test in 2 fratelli, che ha rivelato un accumulo del colesterolo compatibile con un fenotipo biochimico variante.

La presenza della stessa mutazione A1187V in eterozigosi in 4 soggetti malati, aventi lo stesso fenotipo clinico, potrebbe avvalorare l'ipotesi che mutazioni in eterozigosi nei geni NPC1 e NPC2 siano alla base di un fenotipo clinico di malattia di Niemann-Pick ad esordio tardivo?

Michela Marcon

CDC Neurologia Dipartimento Neuroscienze
Ospedale San Bortolo, Vicenza

Una diagnosi da confermare?

Si presenta il caso di una paziente con manifestazioni viscerali isolate ed il riscontro di un'unica mutazione sicuramente patogenetica per NPC1.

La sintomatologia ha avuto esordio all'età di 36 anni con dolore addominale in ipocondrio sinistro, con riscontro di lieve splenomegalia e piastrinopenia.

Alla biopsia midollare evidenziati macrofagi CD68+ con citoplasma chiaro provvisto di materiale PAS+ ed occasionali aspetti di istiociti blu mare, con conseguente sospetto di malattia d'accumulo.

È stata pertanto eseguita analisi enzimatica per Niemann Pick tipo B, risultata negativa.

Il dosaggio degli ossisteroli ha mostrato un aumento del triolo, per

cui è stata effettuata la diagnostica per Niemann Pick tipo C con riscontro di 2 mutazioni del gene NPC1: c.665 A>C (p.N222S), precedentemente descritta in pazienti affetti da NPC; c.2689C>A (p.H987N), non riportata precedentemente in letteratura.

Il Filipin test ha dato come esito un fenotipo variante. Tutti gli accertamenti neurologici sono risultati nella norma, compresa la RMN cerebrale con trattografia e spettroscopia.

Allo studio dei movimenti oculari riscontrate imprecisioni nell'inseguimento della mira.

Possiamo confermare la diagnosi di Niemann Pick C?

Annalisa Sechi

Centro di Coordinamento Regionale Malattie Rare,
Udine

Le manifestazioni psichiatriche nella NPC

Olivier Bonnot Dipartimento Psichiatria infantile e dell'età adolescenziale, CHU e Università di Nantes, Francia

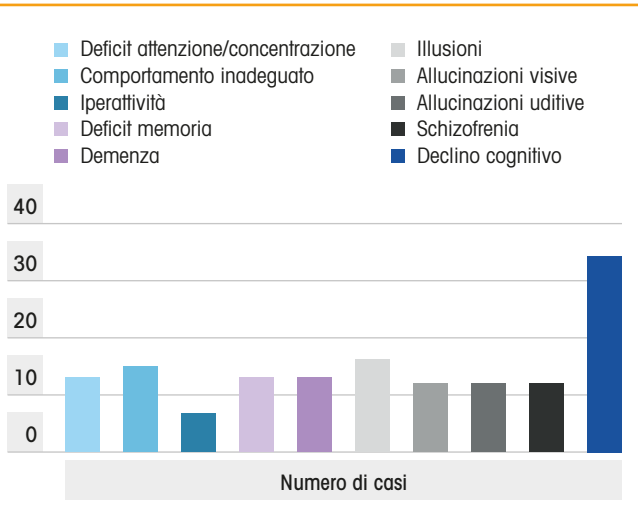
Ai pazienti con NPC che vengono visitati da uno psichiatra sono spesso diagnosticate altre condizioni psichiatriche più diffuse, come schizofrenia, psicosi atipica, disturbi dell'umore, disturbi dello spettro autistico, deficit di attenzione-iperattività in pazienti pediatrici; altre volte questi pazienti restano **senza diagnosi**, poiché ci si concentra sul trattamento delle manifestazioni psichiatriche acute.

Di recente abbiamo effettuato una ricerca sistematica e globale della letteratura per poter identificare, raccogliere e analizzare dati di pazienti individuali già pubblicati. I dati preliminari sono riportati nelle figure 1 e 2.

Il profilo delle manifestazioni psichiatriche che abbiamo osservato nel corso del nostro lavoro è generalmente coerente con altre valutazioni psichiatriche effettuate in coorti che includevano soprattutto pazienti con NPC a esordio in età adolescenziale/adulta. In particolare, la manifestazione psichiatrica predominante nel NPC è risultata la **psicosi**, che spesso si presenta con sintomi simili a quelli di una forma atipica di schizofrenia. In un recente studio su 44 pazienti del Registro Internazionale NPC, le manifestazioni psicotiche sono state riscontrate nel 43% dei pazienti, le manifestazioni relative all'umore nel 39%.

In un altro studio recente, basato su 22 pazienti adulti francesi con NPC sottoposti a valutazione psichiatrica, nel 55% dei soggetti sono state riscontrate manifestazioni psicotiche (soprattutto **manie e allucinazioni**); la metà di questi aveva inizialmente ricevuto una formale diagnosi di schizofrenia. Un altro 23% aveva

Fig. 1 Profilo di manifestazioni psichiatriche in pazienti con NPC



Nei pazienti con malattia di Niemann Pick di tipo C la manifestazione psichiatrica predominante è una forma atipica di schizofrenia

precedentemente ricevuto diagnosi di depressione. Vogliamo porre in evidenza alcune delle difficoltà da superare per l'individuazione e la diagnosi di NPC nella pratica psichiatrica.

Tra gli elementi riconoscibili di patologia psichiatrica atipica che possono suggerire **un sospetto di malattia organica** in pazienti con sintomi simili a quelli della schizofrenia, possiamo trovare stato confusionale acuto, allucinazioni soprattutto visive (più che uditive), un esordio acuto di sintomi psichiatrici, sintomi simil-schizofrenici fluttuanti, resistenza o responso ati-

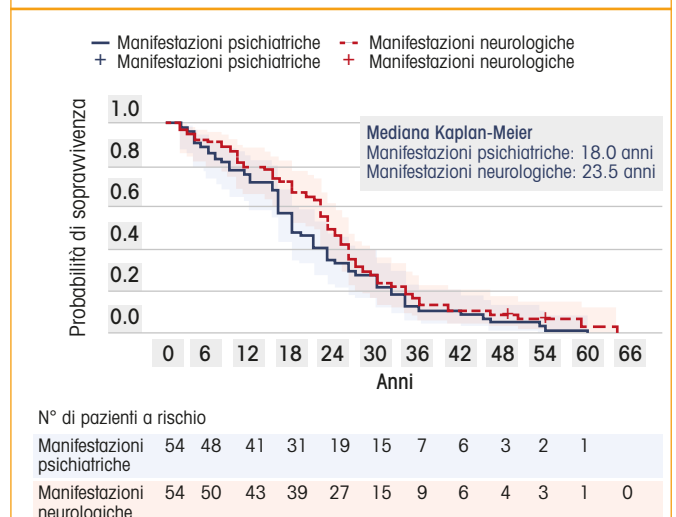


Nella pratica psichiatrica sintomi-chiave per il sospetto di malattia organica sono stato confusionale acuto, allucinazioni visive, sintomi schizofrenici, non risposta agli antipsicotici e decadimento cognitivo precoce

pico ai trattamenti antipsicotici. Un decadimento cognitivo progressivo a esordio precoce concomitante a tratti psicotici è risultato essere un tratto comune tra i casi inclusi nell'analisi ed è un ulteriore, anche se non specifico, segnale di manifestazione psichiatrica atipica piuttosto che primaria.

La malattia di NPC potrebbe non essere rara nella popolazione psichiatrica, e gli psichiatri, così come gli altri medici, dovrebbero sapere quali sono i segnali da riconoscere.

Fig. 2 Sopravvivenza nei pazienti con NPC e sintomi psichiatrici e neurologici



Approccio terapeutico e risultati nelle forme di NPC adulte e giovanili

Alessandro Filla Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Università Federico II, Napoli

Gli approcci terapeutici nella NPC sono vari: riduzione del substrato (miglustat); farmaci agenti sul colesterolo (statine, dieta, 2-idrossipropil-beta-ciclodestrina); farmaci agenti sul calcio (curcumina); *upregulation* di *heat shock protein* (arimoclomol); aumentata espressione della proteina (vorinostat); stabilizzanti del potenziale di membrana (acetil-DL-leucina); antiossidanti (allopregnanolone).

Miglustat è un piccolo imminozucchero che inibisce la sintesi del glucosilceramide e dei gangliosidi GM3-GM2, che si accumulano nel Sistema Nervoso Centrale dei pazienti con NPC. Miglustat non agisce sul colesterolo, passa attraverso la barriera ematoencefalica; in modelli animali murini e felini si ha un minore accumulo di gangliosidi, un ritardo nell'esordio del disturbo neurolo-

gico, un aumento della sopravvivenza. Ci sono vari studi in letteratura su miglustat, usualmente di tipo *open*, osservazionali o retrospettivi. Uno solo è uno studio randomizzato controllato (Patterson 2007). Notevole per la casistica del registro internazionale è lo studio di Patterson (2015) e per la durata quello di Fecarotta (2015) (Tab. 1).

I più frequenti eventi avversi sono di tipo gastrointestinale (diarrea e flatulenza) e perdita di peso. Tali disturbi sono la causa più frequente di sospensione del trattamento e sono dovuti ad inibizione delle disaccarasi intestinali. Possibili rimedi sono *dose-escalation*, modifica-

Miglustat passa la barriera ematoencefalica e riduce l'accumulo di gangliosidi

Tab. 1 Risultati degli studi condotti con miglustat

MIGLUSTAT	PATTERSON, 2007	PATTERSON, 2015	FECAROTTA, 2015
Tipo di studio	Randomizzato e controllato	Osservazionale	Retrospettivo/osservazionale
N° pazienti	41	92/84	25
Pazienti adulti/giovani	29	48	15
Dosaggio	600 mg/die (o per sup. corporea)		600 mg/die (o per sup. corporea)
Durata	22 mesi	24 mesi	48-96 mesi
End-point	Velocità saccadi		
End-point secondari	Deglutizione, deambulazione, cognitivo, uditivo		
Scala	4 item (deglutizione, deambulazione, cognitivo, uditivo)	4 item (deambulazione, destrezza, linguaggio, deglutizione)	6 item (deambulazione, distonia, cognitivo, dismetria, disartria, disfagia)
Esito	↑ saccadi e disfagia	=/↑ Totali 69% Adulti 94% Giovani 79% Infantili 50/30%	A 24 mesi =/↑ nel 70% A 48-96 mesi =/↑ nel 50% (escluso cognitivo)



Tab. 2 NPC: altri farmaci

FARMACO	CELLULE	TOPO	GATTO	UOMO	TRIAL
Agenti su colesterolo					
Statine/acido nicotinicodieta				neg	
Idrossipropil-beta-ciclodestrina	pos	pos	pos	pos	Fase I/II/III (intrafecale)
Agenti su calcio					
Curcumina	pos	pos/neg			
Upregulation heat shock protein					
Arimoclomol	pos				Fase II/III
↑ espressione proteina					
Vorinostat	pos				Fase I/II
Antiossidanti/stabilizzanti					
Allopregnanolone		pos			
Acetil-DL-leucina				pos	

della dieta, integrazione con fermenti lattici a base di *Saccharomyces Boulardii*. Altri effetti avversi comprendono piastrino e leucopenia, aumento delle transaminasi e insonnia.

Altri farmaci in corso di sperimentazione nell'uomo o in modelli animali/cellulari sono riassunti in [tabella 2](#). Per quanto riguarda i farmaci sintomatici, i disturbi psichia-

Tab. 3 NPC: altri segni. Terapie sintomatiche

SEGNI	TRATTAMENTO
Psichiatrici	Antipsicotici atipici/acido valproico/SSRI
Cognitivi	
Epilessia	FAE
Distonia/Tremore	Anticolinergici/Botox
Disfagia	Addensanti
Scialorrea	Amitriptilina/Botox
Cataplessia	Triciclici
Sonno	Melatonina
Diarrea	Loperamide

Diversi i farmaci in sperimentazione e le terapie sintomatiche disponibili

trici e comportamentali possono essere trattati con antipsicotici atipici, valproato, inibitori del reuptake della serotonina (SSRI); le crisi comiziali con farmaci antiepilettici; il tremore e le distonie con farmaci anticolinergici e tossina botulinica; la disfagia con agenti gelificanti; la scialorrea con amitriptilina, tossina botulinica; la cata-tonia con farmaci triciclici; l'insonnia con melatonina. Non vi è terapia per il disturbo cognitivo ([Tab. 3](#)).

Bibliografia

- Patterson MC, Vecchio D, Prady H, et al. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol.* 2007 Sep;6(9):765-72.
- Patterson MC, Mengel E, Vanier MT et al. NPC Registry investigators. Stable or improved neurological manifestations during miglustat therapy in patients from the international disease registry for Niemann-Pick disease type C: an observational cohort study. *Orphanet J Rare Dis.* 2015 May 28;10:65. doi: 10.1186/s13023-015-0284-z.
- Fecarotta S, Romano A, Della Casa R, et al. Long term follow-up to evaluate the efficacy of miglustat treatment in Italian patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2015 Feb 27;10:22. doi: 10.1186/s13023-015-0240-y.





SUPPLEMENTO N°1 ALLA RIVISTA MR - ANNO 1 - N° 2

ISBN: 9788899343378

Publicazione registrata al Tribunale di Milano n. 11 del 10 gennaio 2017

editore **medpoint**

Med Point srl

Via Gallarate, 106 - Milano

Tel. 02 3343281 - Fax 02 38002105

e-mail medpoint srl@medpoint srl.it - www.malattierare.eu

www.medpoint srl.it

Direttore Responsabile: Ida Tacconi

Coordinamento scientifico: Bruno Bembi

Redazione: Anna Invernizzi, Monica Luciani

Direzione grafica: Marcella Ronca

Segreteria di Redazione: Federica Rebora - federica.rebora@medpoint srl.it

Stampa: Magicgraph srl - Busto Arsizio (VA)

© 2017 **Med Point srl** Tutti i diritti riservati. All rights reserved.

Ogni diritto sul presente lavoro è riservato ai sensi della normativa vigente.

La traduzione, l'adattamento, l'elaborazione, la riproduzione con qualsiasi mezzo (compresa la memorizzazione elettronica), totali o parziali, di tutto il materiale contenuto in questa rivista sono riservati per tutti i paesi.

