QUADRIMESTRALE DI ATTUALITA' IN MEDICINA
Pubblicazione registrata al Tribunale di Milano n. 11 del 10 gennaio 2017 - Poste Italiane Spa
Spedizione in Abbonamento Postale - 70% - LO/MI

anno II - n. 2 maggio 2018

IMR la Rivista

La Rivista delle Malattie Rare



L'opinione

Rossella Parini
Screening neonatale esteso delle malattie rare e prevenzione di una carenza vitaminica

review

Reticoloistiocitosi: l'ago nel pagliaio, talvolta, punge
A. Bonometti, E. Berti

il caso clinico

La neurofibromatosi tipo 1: una sindrome da predisposizione ai tumori
G.A. Cagnoli, C. Cesaretti, F. Natacci

Colestasi intraepatiche progressive familiari
B. Parma, S. Tajè, A. Di Cesare Merlone, L. Abbagnato, E. Nicastro, V. Quadri, A. Sonzogni, M. Iascone, L. D'Antiga, A. Selicorni

ricerca e innovazione

Malattie da accumulo lisosomiale: nuove prospettive terapeutiche grazie a CRISPR/Cas9 *M.R. Ceccarini*



SANOFI GENZYME
SPECIALTY CARE DI SANOFI

Ci occupiamo di sclerosi multipla,
malattie rare, oncologia e immunologia.
Lavoriamo insieme al mondo scientifico, alle associazioni,
agli innovatori per migliorare la vita delle persone
che affrontano ogni giorno la disabilità.

SANOFI GENZYME
Empowering Life



sommario

editoriale

Il primo anno insieme *B. Bembi* 5

review

Reticoloistiocitosi: l'ago nel pagliaio, talvolta, punge *A. Bonometti, E. Berti* 7

La neurofibromatosi tipo 1: una sindrome da predisposizione ai tumori
G.A. Cagnoli, C. Cesaretti, F. Natacci 11

l'opinione

Screening neonatale esteso delle malattie rare e prevenzione di una carenza vitaminica *R. Parini* 17

il caso clinico

Colestasi intraepatiche progressive familiari *B. Parma, S. Tajè, A. Di Cesare Merlone, L. Abbagnato, E. Nicastro, V. Quadri, A. Sonzogni, M. Iascone, L. D'Antiga, A. Selicorni* 23

Citopenie immuno-mediate e sindrome di Kabuki *S. Cantoni* 28

pagina dismorfologica

Quando un WES può indirizzare la clinica: un caso di sindrome di Rubinstein-Taybi
S. Tajè, A. Di Francesco, M. Ferrario, D. Marchetti, M. Iascone, A. Selicorni 32

ricerca e innovazione

Malattie da accumulo lisosomiale: nuove prospettive terapeutiche grazie a CRISPR/Cas9 *M.R. Ceccarini* 38

letteratura

Dieta vegana e carenze nutrizionali *E. Daina, R. Parini* 43

direttore scientifico

Bruno Bembi
Direttore Centro di Coordinamento Regionale per le Malattie Rare,
Coordinatore Scientifico Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Udine

comitato di redazione

Daniela Concolino
Responsabile Centro Regionale Pediatria Genetica e Malattie Rare,
Università degli Studi "Magna Græcia", Catanzaro

Daniela Damiani
Professore Associato di Ematologia, Dipartimento di scienze mediche sperimentali e cliniche, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Udine

Erica Daina
Responsabile Laboratorio di Documentazione e Ricerca sulle Malattie Rare,
IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Bergamo

Andrea Elena Dardis
Responsabile Laboratorio, Centro di Coordinamento Regionale per le Malattie Rare,
Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Udine

Emanuela De Juli
Responsabile Coordinamento Aziendale Malattie Rare, Struttura complessa di Pneumologia, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

Laura Obici
Dirigente Medico I livello, Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Dario Roccatello
CMID Centro di Ricerche di Immunopatologia e Documentazione su Malattie Rare, Coordinamento Interregionale Rete Malattie Rare del Piemonte e della Valle d'Aosta, SCDU Nefrologia e Dialisi, Osp. San Giovanni Bosco e Università di Torino

Angelo Selicorni
Direttore Unità Operativa Complessa di Pediatria, ASST-Lariana, Como

Rossella Parini
Consulente medico-scientifico per la Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma, Struttura Semplice Malattie Rare, Clinica Pediatrica,
Ospedale San Gerardo, Monza

norme per gli autori

I contributi spontanei (titolo e scaletta contenutistica) dovranno essere inviati esclusivamente via e-mail, alla Segreteria di Redazione di MR (federica.rebora@medpointsrl.it). Il Comitato di Redazione si riserva di valutarne la pubblicazione sulla testata, dandone pronto riscontro all'Autore.

per richiedere MR

Volete richiedere la Rivista delle Malattie Rare? Collegandovi alla sezione dedicata del sito **http://www.malattierare.eu/pages/richiedi-Rivista** potrete accedere al modulo da compilare per ricevere gratuitamente la rivista al vostro indirizzo.

MR
La Rivista delle Malattie Rare



Il primo anno insieme



Bruno Bembi
Direttore Centro
di Coordinamento
Regionale per le
Malattie Rare,
Coordinatore
Scientifico Azienda
Sanitaria Universitaria
Integrata di Udine

È tempo di bilanci! Nell'incertezza che stiamo vivendo il bilancio del primo anno di attività della nostra rivista ha portato segnali positivi, di cui essere orgogliosi. Segnali che provengono da indicatori "matematici", dal vissuto della redazione e degli autori nonché dalla percezione dei lettori.

La "matematica" ci informa che nel corso del 2017 la rivista è stata visitata da ben 25.866 utenti, per un totale di 36.472 pagine visualizzate nelle singole sessioni. L'analisi delle aree visitate ha evidenziato che nel 60% dei casi i contatti hanno riguardato la componente scientifica della rivista, con la sue varie rubriche. L'archivio delle pubblicazioni è stato il più gettonato, con il 25% delle visite. Il 40% dei visitatori è invece composto dai "curiosi", probabilmente al primo contatto, che visionano home-page e pagina della redazione: ci vogliono conoscere.

Un dato critico è invece quello della provenienza geografica dei visitatori, principalmente localizzato al Nord (85% delle visite). E' un dato in linea con la provenienza dei contributi scientifici, che in quest'anno sono arrivati principalmente da clinici e ricercatori operanti in aziende sanitarie e centri di ricerca del settentrione. Superare questo limite è uno degli obiettivi che ci siamo prefissi per il prossimo futuro.

Veniamo ora a noi, i curatori del giornale: la redazione. Siamo partiti come un gruppetto di amici, uniti dall'entusiasmo e dalla percezione che era necessario allargare la cultura sulle malattie rare ad aree di "non esperti". Siamo tutti professionisti della sanità che, seppur oberati dalla quotidianità degli impegni clinici o di laboratorio, con alti e bassi abbiamo affrontato i compiti che richiede l'editing di una rivista scientifico-divulgativa. Ad ogni numero facciamo disperare l'editore, ma alla fine ce la facciamo sempre.

Proprio per affrontare l'impegno che la rivista richiede e superare i limiti del "gruppo di amici", salvaguardando anche la salute del nostro editore, stiamo provvedendo a riorganizzare il management editoriale per allargare il numero dei collaboratori includendo altri esperti della rete italiana delle malattie rare. Il fine è quello di aumentare la gamma degli argomenti da trattare e di raggiungere una diffusione più capillare ed omogenea. Ne saremo capaci? E' una scommessa che siamo decisi a vincere.

L'elemento primo che sostiene questo ottimismo è il riscontro avuto dai lettori, in termini di numeri (3.000 copie stampate e diffuse per numero) e di visitatori, e in termini di reazioni percettivo-emozionali che ci vengono riferite: la felicità di trovare una pubblicazione scritta in italiano, attenta ad un linguaggio divulgativo, comprensibile, che diffonda quanto di buono viene fatto nelle Malattie Rare nel nostro Paese.

Una testimonianza di questo è il passaggio da una fase in cui gli articoli pubblicati erano conseguenti ad una nostra richiesta agli esperti di settore, alla fase attuale in cui cresce il numero di autori che ci sottopongono il materiale scientifico da pubblicare.

Questa fase espansiva si è arricchita dal mese di maggio 2018 di una nuova esperienza: l'apertura di un programma di formazione a distanza. Chi visiterà il sito www.malattierare.eu nei prossimi giorni troverà queste pagine. Confidiamo che sia un passo proficuo di crescita culturale e di servizio per i clinici italiani e vi auguriamo una buona lettura!

Bruno Bembi

MR la Rivista

La Rivista delle Malattie Rare



raddoppia e diventa anche FAD

La proposta educazionale di MR aumenta: a partire da maggio 2018, ogni numero della rivista sarà collegato ad una **FAD** (Formazione a Distanza), con erogazione dei crediti formativi ECM

www.malattierare.eu

per leggere MR e i supplementi, richiedere la rivista, contattare la redazione e per accedere alla FAD di MR

MR La Rivista delle Malattie Rare

Reticoloistiocitosi: l'ago nel pagliaio, talvolta, punge



Arturo Bonometti[1], Emilio Berti[2,1]
[1]Dipartimento di Patofisiologia medico-chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano, Milano;
[2]Dipartimento di Dermatologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Le reticoloistiocitosi sono un gruppo estremamente raro e clinicamente eterogeneo di malattie proliferative/infiammatorie dei monociti, di interesse principalmente dermatologico e reumatologico e accumunate dalle loro caratteristiche istopatologiche. All'interno del gruppo, si distinguono:

- **la reticoloistiocitosi multicentrica (RM)**, forma sindromica più comune, caratterizzata da artrite ingravescente e deformante associata a lesioni cutanee (tra le più caratteristiche quelle juxta-articolari e paraonichiali);
- **il reticoloistiocitoma solitario (RS)**, forma a interessamento generalmente cutaneo che si presenta come lesione singola localizzata sul tronco o sugli arti;
- **la reticoloistiocitosi diffusa (RD)**, forma a interessamento cutaneo o delle mucose, caratterizzata da lesioni multiple, diffuse in maniera simmetrica a livello di tronco, arti e regione testa-collo.

Il termine "reticoloistiocitosi" viene coniato nel 1950 da Zak, ma la prima descrizione di queste malattie risale probabilmente a Targett nel 1897. La loro **incidenza è sconosciuta**, ma si stima siano stati pubblicati circa 300 casi di RM, 100 casi di RS e meno di 30 casi di RD (spesso misdiagnosticata come RM sine artrite). L'età media di insorgenza è di 40-50 anni per la RM, mentre è inferiore nel RS e nella RD (35 anni). La RM colpisce prevalentemente il sesso femminile (rapporto M:F=1:3), mentre il RS e la RD colpiscono maggiormente il sesso maschile (rapporto M:F=1.4-2:1).
La RM si presenta spesso in soggetti affetti da malattie autoimmunitarie quali artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sjögren, sclerosi sistemica. Inoltre, sia RM che RD possono **associarsi a neoplasie**, ma con modalità differenti. Circa un quarto dei casi di RM si accompagna allo sviluppo di tumori (generalmente carcinomi); al contrario, nei pazienti affetti da RD, la diagnosi della malattia è strettamente associata a quella di una neoplasia ematologica che nella maggior parte dei casi descritti è una leucemia mieloide acuta (LMA).

Le reticoloistiocitosi sono un gruppo eterogeneo di malattie proliferative/infiammatorie dei monociti di interesse reumatologico e dermatologico con caratteristiche istopatologiche tipiche

Patogenesi

Ad oggi non si conosce l'esatta eziopatogenesi delle reticoloistiocitosi.
Nella RM la patogenesi sembrerebbe legata all'infiammazione sistemica; infatti nella RM sono incrementati sia i livelli sierici che sinoviali di varie citochine pro-infiammatorie (TNF-α, IL-1β, IL-6). Inoltre, la frequente associazione tra RM e malattie neoplastiche ha portato talvolta a considerare questa forma di reticoloistiocitosi come una sindrome paraneoplastica, quando invece è più probabilmente legata ad una generale condizione di infiammazione sistemica, non necessariamente secondaria a neoplasia. Infine, l'utilizzo di antagonisti di TNF-α e IL-1 si è recentemente dimostrato efficace nel controllare i sintomi della malattia, evidenziando ancora una volta lo stretto rapporto patogenetico tra RM e infiammazione.
Similmente alla RM, anche il RS sembrerebbe essere una malattia legata all'infiammazione ma come espressione di una reattività locale,

come suggerito dalle frequenti descrizioni di associazione con traumi o punture d'insetto.
Delle tre forme di reticoloistiocitosi la RD è l'entità più rara e meno compresa, forse anche per la frequente misdiagnosi con RM, istiocitosi generalizzata eruttiva e malattia di Rosai-Dorfman. Dalla prima descrizione, nel 1982, almeno 7 casi riportati in letteratura sono associati a neoplasie ematologiche, di cui 6 associati a LMA. In un caso inoltre, è stata dimostrata l'associazione clonale tra reticoloistiocitosi e LMA con infiltrazione del midollo osseo da parte di entrambe le malattie. Questi dati sembrano suggerire per la RD, almeno in alcuni casi, una patogenesi proliferativa clonale del midollo ematopoietico, con disseminazione alla cute.
In nessun paziente affetto da RM e da RS è mai stata dimostrata una monoclonalità delle cellule della malattia. In un caso di RM è descritta la negatività della mutazione BRAF-V600E.

Clinica

Le tre entità RM, RS e RD sono differenziate in base alle caratteristiche cliniche ma **la diagnosi di reticoloistiocitosi è squisitamente istopatologica**. Di conseguenza, l'approccio diagnostico a queste malattie richiede l'esame istopatologico di una biopsia cutanea, oltre all'inquadramento clinico e all'esecuzione di esami radiologici e di laboratorio.

La **RM** si presenta clinicamente, nel 70% dei casi, per una **poliatralgia**. I sintomi e i segni, indagabili con metodica radiografica o con risonanza magnetica, sono legati allo sviluppo di una poliartrite erosiva, progressiva e simmetrica, interessate principalmente le articolazioni interfalangee distali, le metacarpofalangee e quelle del ginocchio e della spalla. Lo scheletro assiale e le altre articolazioni degli arti possono essere comunque interessate, sebbene con minor frequenza. In metà dei pazienti l'artropatia progredisce verso un quadro deformante e disabilitante (arthritis mutilans), mentre nei restanti casi può stabilizzarsi (40%) o regredire (10%).

L'approccio diagnostico richiede l'esame istopatologico di una biopsia cutanea, oltre all'inquadramento clinico e all'esecuzione di esami radiologici e di laboratorio

Gli aspetti radiologici (lesioni erosive periarticolari ben delimitate senza rimaneggiamento osseo), quelli clinici (interessamento delle articolazioni interfalangee distali, lesioni cutanee) e la negatività per il fattore reumatoide e gli anticorpi anti-proteine citrullinate (CCP), permettono di differenziare la RM dall'artrite reumatoide, dall'artrite psoriasica e dall'osteoartrosi.
Nella RM le lesioni cutanee compaiono mediamente dopo 2-3 anni dalla comparsa della sintomatologia articolare e consistono in papule e noduli multipli di colore bruno-rossastro e di dimensioni variabili tra 0.1 – 2 cm di diametro. Le localizzazioni più comuni della malattia sulla cute sono quella juxta-articolare, sul tronco ed il volto. Caratteristica, a livello delle mani, è la disposizione paraonichiale in serie di piccole lesioni (segno della "collana di perle"). Un terzo dei pazienti sviluppa xantelasma. Sono stati occasionalmente descritti pazienti affetti da RM con coinvolgimento cardiaco, polmonare, faringeo, epatico e dell'apparato urinario talora con esito fatale. Le indagini di laboratorio non forniscono elementi diagnostici specifici, ma sono utili ai fini della diagnostica differenziale.
Nella RM non sono generalmente rilevati autoanticorpi al di fuori dei pazienti che presentano contestualmente patologie autoimmunitarie. Circa metà dei pazienti presenta incremento degli indici infiammatori ed un terzo alterazioni del profilo lipidico. Le analisi del fluido sinoviale possono contribuire alla diagnosi differenziale, escludendo la presenza di cristalli o di una artropatia settica. In alcuni casi è stata descritta la scomparsa dei sintomi della RM in seguito alla remissione di neoplasie a cui essa era associata. La prognosi della RM in sé è comunque buona e la malattia tende alla quiescenza dopo un decorso di circa 5-10 anni.

Il **RS**, al contrario della RM, è una malattia dermatologica nella maggioranza dei casi. I pazienti sviluppano lesioni singole, sotto forma di papule o noduli di colore bruno-giallastro, asintomatici e di diametro generalmente inferiore al cm. Nella maggior parte dei pazienti la lesione si localizza a livello del tronco, degli arti o della regione testa-collo. In alcuni casi è stata descritta la completa **autorisoluzione** del quadro cutaneo a distanza di pochi mesi dall'insorgenza. Le indagini cliniche e di laboratorio danno esisti negativi. Sovente la diagnosi di RS è inaspettata nel corso di una biopsia cutanea eseguita per la conferma istologica di un sospetto di nevo, di dermatofibroma o di carcinoma cutaneo. Recentemente sono stati descritti una serie di casi di RS a

localizzazione extracutanea (nodale, palpebrale, orbitale e del canale uditivo) con storia naturale sovrapponibile ai casi con interessamento cutaneo.

La **RD** si manifesta generalmente con un'improvvisa **eruzione papulare** bruno-rossastra o giallastra generalmente asintomatica o al più legata ad astenia.
Le lesioni possono raggiungere i 2 cm di diametro e coinvolgono il tronco, gli arti e la regione testa-collo, similmente al RS, mentre risparmiano le regioni paraonichiali e juxta-articolari. La diagnosi differenziale richiede l'esclusione di quei casi di RM che si presentano con lesioni cutanee in assenza di artrite (la localizzazione delle lesioni è d'aiuto nell'inquadramento). Gli approfondimenti radiografici risultano negativi. In caso di alterazioni della crasi ematica può essere opportuno eseguire una **biopsia osteo-midollare** per escludere la compresenza di neoplasie ematologiche. Le manifestazioni cutanee hanno andamento cronico e possono aumentare in numero e/o dimensioni anche dopo trattamento.

Istopatologia

Nelle reticoloistiocitosi, tutti i tessuti coinvolti (cute, mucose, sinovie) presentano microscopicamente un infiltrato dermico costituito da numerosi monociti di grandi dimensioni con nucleo cospicuo, nucleolo prominente e citoplasma chiaro, frammisti a tipiche **cellule giganti**, mono o multi-nucleate, con nuclei disposti in maniera disordinata nell'abbondante citoplasma eosinofilo e finemente granulare (**a vetro smerigliato**). A queste cellule si accompagna un contorno infiammatorio costituito principalmente da piccoli linfociti e granulociti neutrofili. L'epidermide e gli annessi sono risparmiati. Le cellule della malattia presentano **immunofenotipo** CD163+, CD68+, fascina+, fattore-XIIIa+, lisozima+, vimentina+, S100+/-, CD1a-, CD207-. Ormai aneddotica è la presenza di inclusioni citoplasmatiche pleomorfe e collagenofagocitosi in buona parte dei pazienti affetti da RM alle indagini di microscopia elettronica.

Le reticoloistiocitosi sono malattie rare ma potenzialmente gravi anche in virtù della loro frequente associazione con patologie oncologiche

Terapia

Se si esclude l'efficacia della biopsia come terapia risolutiva per il RS, al momento non esiste un consenso in merito al trattamento delle reticoloistiocitosi.
Recentemente, sulla base di una approfondita revisione della letteratura, è stato proposto un algoritmo diagnostico-terapeutico per la RM. Nei pazienti con malattia di grado moderato, i farmaci più efficaci sembrerebbero essere il **prednisone** (dose di attacco 0.25-0.6 mg/kg/die, con successivo decalage sotto i 0.15 mg/kg/die e mantenimento in base allo stato clinico) e il **metotrexate** (7.5-25 mg/settimana), associati o meno a FANS. In caso di mancata risposta terapeutica o in presenza di malattia di grado severo si possono considerare associazioni di prednisone e metotrexate, con eventuale aggiunta di un farmaco biologico anti-TNF-α (quali etanercept, infliximab, adalimumab). In terza linea possono essere valutate associazioni con altri biologici anti CD20 (rituximab) e con anti-IL-1 (anakinra). I bifosfonati vanno utilizzati con cautela e solo nei casi di mancato controllo della malattia oppure in presenza di concomitante osteopenia/osteoporosi.
Per quanto riguarda la RD, le lesioni cutanee possono permanere invariate nel follow-up senza riscontro di coinvolgimento sistemico anche per anni ed in assenza di trattamento. In due casi emblematici, le lesioni sono involute o risolte con l'utilizzo di PUVA terapia associata o meno a corticosteroidi intralesionali. Nei casi più drammatici di RD associata a LMA, la terapia prevede una polichemioterapia che tuttavia non sempre risulta risolutiva.

Conclusioni

Le reticoloistiocitosi sono malattie estremamente rare ma potenzialmente gravi ed invalidanti anche in virtù della loro frequente associazione con malattie oncologiche.
Ad oggi solo due delle tre entità note sono collocate nella classificazione delle istiocitosi.
La RD è infatti dimenticata dai più, per via dello scarso numero di casi descritti, e perché sovente viene assimilata alla RM, supponendo che solo il numero di lesioni cutanee differenzi quest'ultima dal RS.
Ai fini diagnostici-terapeutici, sembra però opportuno separare le tre entità in base al numero di **apparati** e **organi coinvolti**; (la RM é una malattia multisistemica di interesse dermatologico e reumatologico, mentre le altre due sono unisistemiche di interesse esclusivamente dermatologico) e al **numero di lesioni cutanee** (singole nel RS, multiple nella RD), prestando attenzione alla possibile presenza di tumori solidi o neoplasie

Le prospettive di intervento future puntano a potenziare la comprensione dei meccanismi eziopatogenici di queste malattie, ricorrendo anche alla diagnostica molecolare per la caratterizzazione delle varie forme

ematologiche associate.
Il follow-up diventa di estrema importanza per monitorare l'evoluzione della malattia, la risposta terapeutica e, ove possibile, la prevenzione di sequele invalidanti.
Il futuro deve essere rivolto al potenziamento della comprensione dei meccanismi eziopatogenici di queste malattie, ricorrendo anche all'impiego della diagnostica molecolare nella caratterizzazione delle diverse forme.
In conclusione, mentre al momento l'esigenza principale è quella di raggiungere la diagnosi di malattia in tempi rapidi e di identificare l'eventuale associazione con malattie neoplastiche o autoimmunitarie, le prospettive future sono rivolte al raggiungimento di un consenso e nel creare una piattaforma condivisa di esperti, atta a studiare i diversi aspetti clinico-patologici delle reticoloistiocitosi al fine di ottimizzare la valutazione diagnostica, prognostica e terapeutica.

Bibliografia

1. Berti E, Zelger B, Caputo R. Reticulohistiocytosis. In WHO classification of tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon, France: IARC Press, 2006. - ISBN 92-832-2414-0. - p. 224-225.
2. Luz FB, Kurizky PS, Ramos-e-Silva M. Reticulohistiocytosis. Dermatol Clin. 2007;25(4):625-32, x.
3. Tariq S, Hugenberg ST, Hirano-Ali SA, et al. Multicentric reticulohistiocytosis (MRH): case report with review of literature between 1991 and 2014 with in depth analysis of various treatment regimens and outcomes. Springerplus. 2016; 25;5:180.
4. Miettinen M, Fetsch JF. Reticulohistiocytoma (solitary epithelioid histiocytoma): a clinicopathologic and immunohistochemical study of 44 cases. Am J Surg Pathol. 2006; 30(4):521-8.
5. Goette DK, Odom RB, Fitzwater JE Jr. Diffuse cutaneous reticulohistiocytosis. Arch Dermatol. 1982; 118(3):173-6.
6. Zelger BW, Sidoroff A, Orchard G, et al. Non-Langerhans cell histiocytoses. A new unifying concept. Am J Dermatopathol. 1996; 18(5):490-504.
7. Emile JF, Abla O, Fraitag S, et al. Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. Blood. 2016; 127(22):2672-81.
8. Berres ML, Allen CE, Merad M. Pathological consequence of misguided dendritic cell differentiation in histiocytic diseases. Adv Immunol. 2013;120:127-61.
9. Fusco N, Bonometti A, Augello C, et al. Clonal reticulohistiocytosis of the skin and bone marrow associated with systemic mastocytosis and acute myeloid leukaemia. Histopathology. 2017;70; 1000-1008.
10. Aouba A, Leclerc-Mercier S, Fraitag S, et al. Assessment and effective targeting of Interleukin-1 in multicentric reticulohistyocytosis. Joint Bone Spine. 2015; 82(4):280-3.
11. Dawe RS, Cameron H, Lowe JG. PUVA for diffuse cutaneous reticulohistiocytosis. Br J Dermatol. 1998; 138(4):720-1.
12. Harris AG, Wijayanti A, Llewellyn M, et al. Multiple cutaneous reticulohistiocytomas successfully treated with topical psoralen plus ultraviolet A therapy combined with intralesional injections of triamcinolone acetonide. JAAD Case Rep. 2015; 1(3):157-9.

MR La Rivista delle Malattie Rare

La neurofibromatosi tipo 1: una sindrome da predisposizione ai tumori



Giulia Anna Cagnoli, Claudia Cesaretti, Federica Natacci
UOSD Genetica Medica, Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

La neurofibromatosi tipo 1 (NF1) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante, con penetranza completa entro gli 8 anni circa, a prevalente interessamento neurocutaneo associato a complicanze multisistemiche. Si tratta di una condizione panetnica e la sua incidenza è pari a 1:2.500-3.000. In circa il 50% dei casi è ereditata da un genitore, mentre nella restante porzione i soggetti affetti da NF1 sono gli unici del loro nucleo familiare (casi sporadici o *de novo*).

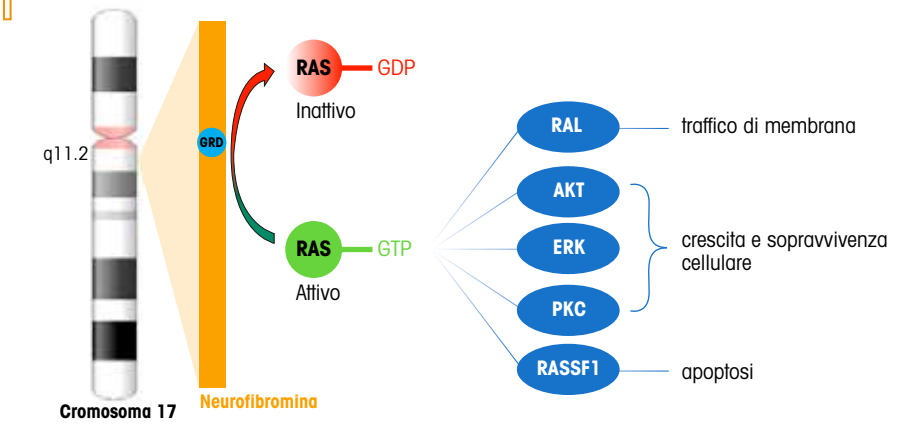
Eziologia

La NF1 è causata da alterazioni in eterozigosi a carico del gene onco-soppressore NF1 (17q11.2), che codifica per la proteina **neurofibromina**, coinvolta nella regolazione negativa del pathway RAS, implicato nella proliferazione e differenziazione cellulare (Fig. 1). Nella maggior parte dei casi si tratta di mutazioni inattivanti, che causano una loss-of-function del gene NF1, con conseguente produzione di ridotti livelli di neurofibromina; circa il 5% dei pazienti presenta invece una microdelezione a carico della regione 17q11.2 comprendente l'intero gene NF1.
Ad oggi non è possibile stabilire una correlazione tra l'alterazione genetica e le eventuali manifestazioni cliniche della neurofibromatosi (correlazione genotipo-fenotipo), eccetto che per alcuni casi specifici, in particolare:

- la microdelezione 17q11.2, che è associata ad un fenotipo più severo, dato da: comparsa più precoce e numero maggiore di neurofibromi, dismorfismi facciali caratteristici, disabilità intellettiva e rischio aumentato rispetto agli altri soggetti con NF1 di sviluppare un tumore maligno della guaina dei nervi periferici (1)
- la delezione in-frame di 3bp a carico dell'esone 17, che è solitamente associata ad un fenotipo più lieve, con assenza di neurofibromi cutanei e plessiformi (2)
- la mutazione missenso c.5425C>T

La neurofibromatosi tipo 1 è una malattia genetica neurocutanea associata a complicanze multisistemiche, causata dalle mutazioni nel gene oncosoppressore NF1

Fig. 1 **Pathway RAS**



Oltre alla componente cutanea, NF1 può presentare anche complicanze oculistiche, ortopediche, neurologiche, internistiche, endocrinologiche ed oncologiche

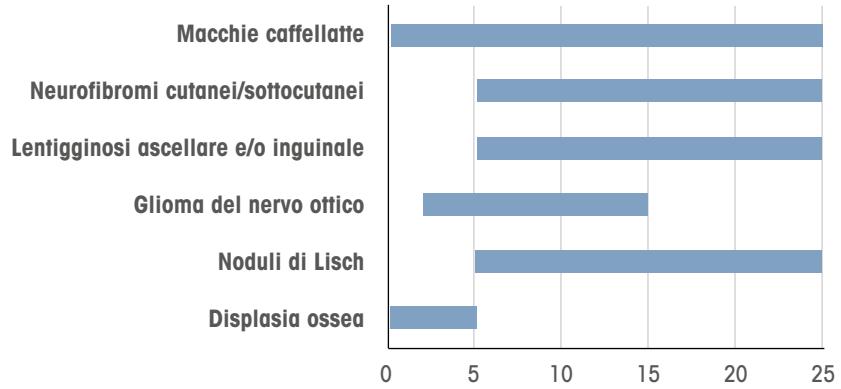
(p.Arg1809Cys): analogamente alla delezione sopracitata, tale alterazione sembra essere correlata ad un fenotipo lieve, caratterizzato da macchie cutanee caffellatte e feckling, in assenza di neurofibromi (3).

La condizione si caratterizza per la comparsa età-specifica dei segni/sintomi (cutanei e sistemici) e delle complicanze associate (Fig. 2). La diagnosi clinica si basa sulla presenza di almeno due dei criteri diagnostici definiti nel 1987 dal National Institutes of Health (NIH) Consensus Conference (Tab. 1).

Clinica

Nonostante NF1 sia conosciuta soprattutto per la componente cutanea/estetica (macchie caffellatte, lentigginosi ascellare e inguinale, neurofibromi cutanei, sottocutanei o plessiformi), si tratta di una patologia complessa ed eterogenea, che oltre alle manifestazioni sopracitate può dare un coinvolgimento di più organi e apparati; circa un quarto dei soggetti affetti può infatti sviluppare complicanze oculistiche, ortopediche, neurologiche, internistiche, endocrinologiche e oncologiche. Rispetto alle ultime, il rischio generale di sviluppare un tumore (oltre ai neurofibromi cutanei, sottocutanei e plessiformi) nella popolazione affetta da NF1 è stimato essere superiore del 5-15% rispetto a quello della popolazione generale.

Fig. 2 **Criteri diagnostici di NF1 ed età di insorgenza**



I meccanismi oncogenetici non sono ancora del tutto chiari; è noto che per il manifestarsi della maggior parte delle caratteristiche cliniche della patologia, come le macchie cutanee color caffellatte e i neurofibromi, oltre alla mutazione costituzionale (germinale) è necessario che si verifichi una seconda mutazione somatica a carico dell'allele non mutato (wild-type) del gene NF1; questa condizione (modello second-hit), tuttavia, non è sufficiente perché si sviluppi una trasformazione maligna (4). Perché si verifichi tale evento sono infatti indispensabili ulteriori alterazioni genetiche, ad oggi non ancora del tutto determinate, tra cui mutazioni e/o modificazioni epigenetiche in altri geni che controllano la proliferazione, il differenziamento, la morte e l'integrità del patrimonio genetico cellulare, andando a costituire un processo "multistep".

Rischio oncologico

Nonostante le complicanze della NF1 siano numerose, le neoplasie costituiscono la causa di morte più comune negli individui affetti da NF1

Tab. 1 **Criteri diagnostici di NF1 (almeno 2 dei seguenti criteri):**

- 6 o più macchie caffellatte (di dimensioni >0.5 cm nei bambini in età prepubere oppure >1.5 cm negli adulti)
- 2 o più neurofibromi cutanei/sottocutanei oppure 1 o più neurofibromi plessiformi
- Lentigginosi ascellare o inguinale
- Glioma delle vie ottiche
- 2 o più noduli di Lisch
- Displasia ossea (displasia dell'ala dello sfenoide, incurvamento delle ossa lunghe, con o senza pseudoartrosi)
- Presenza di un familiare di 1° grado affetto secondo questi stessi criteri

Tratto da: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Neurofibromatosis. Bethesda, 1987

Tab. 2 **Età di insorgenza e incidenza di alcune neoplasie in soggetti affetti da NF1 e in soggetti della popolazione generale.**

	MPNSTs		Carcinoidi		GISTs		OPGs	
	NF1	Sporadici	NF1	Sporadici	NF1	Sporadici	NF1	Sporadici
Incidenza	2-29%	0.001%	1%	0.00003%	3.9-25%	0.0001%	5-25%	2-5%
Età	20-23	50-60	21-70	40-70	50	60	<6	9

MPNST, Tumore Maligno della Guaina dei Nervi Periferici; GIST, Tumore stromale del tratto gastrointestinale; OPG, Glioma delle Vie Ottiche. Tratto da The Oncologist, Patil et al. 2012

Per la corretta presa in carico dei pazienti con NF1, alcuni PDTA regionali prevedono l'intervento di un team multidisciplinare di specialisti ed operatori sanitari

e provocano una riduzione dell'aspettativa di vita che può arrivare a 10-15 anni in meno rispetto alla popolazione generale (5). Per questo motivo si è scelto, in questa sede, di approfondire tale problematica (per una review completa sulla NF1 si rimanda al recente lavoro di Gutmann et al. (6)).

Sebbene alcuni tumori NF1-associati abbiano un andamento generalmente benigno e spesso richiedano un trattamento conservativo, alcune neoplasie correlate a NF1 possono presentare un decorso severo. Il rischio oncologico aumentato riguarda più frequentemente neoplasie di origine nervosa e del tessuto connettivo, tuttavia è noto che anche altri tumori solidi possono occorrere in un individuo affetto da NF1, sia in età infantile che adulta; nella maggior parte dei casi si tratta di neoplasie molto rare nella popolazione generale e spesso l'età di insorgenza nei pazienti affetti da NF1 è ridotta rispetto ai casi sporadici.

Nella tabella 2 sono riportate, a titolo di esempio, le diverse incidenze ed età di insorgenza tra popolazione NF1 e popolazione generale di quattro differenti tumori associati alla condizione in oggetto.

E' indispensabile che il clinico di riferimento conosca tali complicanze, le loro caratteristiche cliniche e i sintomi ad esse correlati e crei con il paziente un'alleanza terapeutica, trasmettendogli le informazioni necessarie perché possa essere sensibilizzato sui sintomi di allarme; in molti di questi casi, infatti, la precocità della diagnosi è di fondamentale importanza per garantire una corretta e tempestiva presa in carico diagnostico/terapeutica, modificando anche notevolmente la prognosi della malattia.

Per una corretta presa in carico dei pazienti con NF1 sono stati definiti a livello regionale dei Percorsi Diagnostico-Terapeutici Assistenziali (PDTA), basati sulle evidenze più recenti della letteratura nazionale ed internazionale, che prevedono l'intervento di un team multidisciplinare di specialisti ed operatori sanitari (per il PDTA della Regione Lombardia si veda http://malattierare.marionegri.it/content/view/123).

Caratteristiche cliniche e approcci terapeutici

E' bene ricordare che a seguito del sospetto clinico è opportuno indirizzare il paziente nei centri di riferimento specifici per la problematica, in modo tale che possa essere messo in atto un corretto e aggiornato percorso diagnostico e terapeutico.

Tumori del Sistema Nervoso Centrale (SNC)

I tumori del SNC si manifestano in circa il 20% dei soggetti affetti da NF1 e sono circa 5 volte più frequenti rispetto alla popolazione generale:

Glioma delle vie ottiche (OPG): si tratta di una neoplasia gliale di basso grado (astrocitoma pilocitico), che insorge solitamente entro la prima decade, con un picco tra i 4 e i 5 anni e interessa fino al 15% dei bambini con NF1 (7) (8); sebbene possa essere colpita tutta la via ottica, nell'NF1 il tratto più frequentemente interessato è quello anteriore. I gliomi delle vie ottiche in questi casi, a differenza di quelli sporadici, presentano tipicamente un decorso indolente, con crescita lenta o nulla e talvolta con possibilità di regressione spontanea. Nella maggior parte dei casi rimangono asintomatici; solo una proporzione variabile da un terzo alla metà dei casi sviluppa sintomi, che possono essere diversi a seconda della sede interessata (proptosi, riduzione dell'acuità visiva/del campo visivo, pubertà precoce). Il trattamento di prima scelta è la chemioterapia ed è indicato solo in caso di chiara evidenza di progres-

sione clinico-radiologica della malattia (negli altri casi si adotta un atteggiamento conservativo, con sorveglianza clinica e strumentale).

Gliomi del tronco cerebrale: costituiscono la seconda più frequente neoplasia intracranica nei pazienti con NF1; anch'essi colpiscono soprattutto in età infantile e sono localizzati prevalentemente nel midollo allungato (9). L'istotipo più frequente è l'astrocitoma pilocitico e il decorso è generalmente benigno (a differenza dei casi sporadici), con crescita lenta e possibilità di regressioni spontanee; spesso sono sintomatici all'esordio (la cefalea costituisce il sintomo più frequente). Il trattamento solitamente è conservativo, con sorveglianza clinica e neuroradiologica; nei casi che presentano una rapida crescita o diventano sintomatici la terapia di scelta è la resezione chirurgica, quando anatomicamente possibile.
Sono descritti anche gliomi cerebellari e cerebrali (che tendono a presentare una maggiore aggressività rispetto a quelli del tratto ottico-chiasmatico e del tronco encefalico) e, più raramente, ependimomi e medulloblastomi. Nei pazienti di età superiore a 10 anni la prevalenza di gliomi di alto grado è aumentata di 50-100 volte rispetto alla popolazione generale.

Il rischio oncologico correlato a NF1 riguarda più frequentemente neoplasie di origine nervosa e del tessuto connettivo, ma anche altri tumori solidi rari nella popolazione generale

Tumori extra-SNC

Tumori maligni della guaina dei nervi periferici (MPNST): si tratta di sarcomi che insorgono a partenza dalle cellule di Schwann dei nervi periferici; possono colpire qualsiasi distretto anatomico, ma si riscontrano più frequentemente nelle porzioni prossimali degli arti e nel tronco. Il rischio di sviluppare un MPNST per una persona affetta da NF1 durante l'arco della vita è pari all'8-13% (10); la prognosi è peggiore rispetto ai casi di MPNST sporadici. Solitamente si manifestano nella II-III decade (sono rari nell'infanzia), insorgono da un neurofibroma plessiforme o sottocutaneo pre-esistente (mai da neurofibromi cutanei) ed esordiscono con dolore persistente, tipicamente notturno, e non responsivo alla terapia antidolorifica; possono inoltre essere presenti modificazioni nelle dimensioni e nella consistenza della lesione pre-esistente, comparsa di deficit neurologici inspiegati (11).
Il rischio di sviluppare un MPNST è aumentato di 3 volte in presenza di neurofibromi sottocutanei e di 10 volte in presenza di neurofibromi interni/plessiformi (talvolta la diagnosi è complessa perché originano da lesioni non rilevabili all'esame obiettivo); il rischio è aumentato anche nei soggetti che in passato hanno subito radioterapia, che presentano un'anamnesi familiare positiva per tumore, o in cui l'analisi genetica abbia messo in evidenza la presenza di una delezione dell'intero gene NF1. Il trattamento prevede la resezione completa – se possibile a seconda della localizzazione anatomica – con radioterapia adiuvante per tutte le neoplasie di grado intermedio/alto; la chemioterapia viene riservata ai casi che presentano metastasi o che non sono asportabili chirurgicamente.

Nei pazienti di età superiore a 10 anni la prevalenza di gliomi di alto grado è aumentata di 50-100 volte rispetto alla popolazione generale

Tumori stromali del tratto gastrointestinale (GIST): sono neoplasie mesenchimali che insorgono a partenza dalle cellule interstiziali di Cajal o dai loro progenitori e possono colpire qualsiasi porzione del tratto gastroenterico; tuttavia, mentre i casi sporadici insorgono prevalentemente a livello gastrico, i GIST associati ad NF1 colpiscono soprattutto il piccolo intestino e talvolta possono essere multifocali. Si stima che il rischio per una persona affetta da NF1 di sviluppare tale complicanza sia superiore di circa 45 volte rispetto a quello della popolazione generale (4).
Solitamente sono asintomatici; solo il 5% dei casi esordisce con una sintomatologia aspecifica data da dolore addominale, segni di sanguinamento gastroenterico e raramente ostruzione intestinale. La prognosi è solitamente migliore rispetto ai casi sporadici e il trattamento di scelta prevede la resezione chirurgica.

Feocromocitomi: si tratta di tumori che originano dalle cellule cromaffini del neuroectoderma a livello della midollare del surrene o dei gangli del sistema simpatico, la cui caratteristica è quella di secernere catecolamine. Colpiscono circa l'1% dei soggetti con NF1 e sono solitamente solitari e monolaterali. L'ipersecrezio-

ne di catecolamine provoca ipertensione arteriosa, che solitamente è associata a cefalea, palpitazioni, sudorazione profusa e stato d'ansia. La prognosi dei feocromocitomi associati ad NF1 è generalmente buona e il trattamento chirurgico risulta risolutivo nel 95% dei casi; la chemioterapia è riservata ai casi che presentano metastasi.

Tumore della mammella: nelle donne affette da neurofibromatosi tipo 1 è descritto un rischio aumentato di cinque volte di sviluppare tale complicanza prima dell'età di 50 anni e, in generale, un rischio di sviluppare il tumore della mammella (in particolare soprattutto carcinomi duttali invasivi) aumentato di 3,5 volte rispetto alla popolazione generale (12). Per tale motivo è indicato che le donne affette da NF1 eseguano controlli senologici/mammografici annuali a partire dai 40 anni. Il trattamento non differisce da quello utilizzato nei casi sporadici.

Carcinoidi (o tumori neuroendocrini): si tratta di neoplasie neuroendocrine che originano dalle cellule della mucosa o sottomucosa del tratto gastrointestinale o dei polmoni, ma possono coinvolgere anche il mediastino, il timo, il pancreas, il fegato, i reni, i testicoli, le ovaie o la prostata. Colpiscono circa l'1% dei soggetti con NF1 e coinvolgono quasi esclusivamente la regione duodenale periampullare. Nella maggior parte dei casi si tratta di somatostatinomi. Generalmente si presentano con ittero, dolore addominale aspecifico, calo ponderale; meno comuni sono la melena, l'anemia da carenza di ferro, l'ostruzione intestinale e la pancreatite; la sindrome da somatostatinoma (diabete, diarrea e calcoli biliari) è estremamente rara e il quadro clinico può rispondere alla terapia con analoghi. Il trattamento consiste nella resezione chirurgica, ove possibile.

I tumori dei glomi subungueali costituiscono una problematica di grande impatto, nonostante la sintomatologia venga spesso sottovalutata e la diagnosi sia ancora spesso tardiva

Tumori dei glomi subungueali

Pur trattandosi di una condizione benigna, costituiscono una problematica di grande impatto nella vita quotidiana a causa della loro sintomatologia importante, che spesso viene sottovalutata, e la cui diagnosi è ancora troppo tardiva. I tumori dei glomi subungueali sono neoformazioni rare nella popolazione generale - rappresentando meno del 2% delle neoplasie della mano – certamente più frequenti nei soggetti affetti da NF1, sebbene ad oggi l'incidenza non sia ancora definita con precisione.

I tumori glomici sono costituiti da un'iperplasia benigna delle cellule mioepitelioidi dei corpi glomici, ossia unità funzionali arterovenose precapillari deputate alla termoregolazione vascolare, localizzati a livello del tessuto sottocutaneo soprattutto a livello delle falangi distali delle dita, in particolare al di sotto del letto ungueale.

Si manifestano come neoformazioni a lenta crescita, di dimensioni variabili da alcuni millimetri ad alcuni centimetri (le tumefazioni più rilevanti possono manifestarsi come deformità della placca ungueale), talvolta di colorito rosso-violaceo; spesso sono multifocali, a differenza dei casi sporadici (13).

Il sintomo cardine è il dolore acuto localizzato al polpastrello o alla base dell'unghia corrispondente, spontaneo o correlato a stimoli meccanici anche in seguito a traumi di lieve entità; tipicamente il dolore aumenta con le basse temperature e diminuisce con il calore o esercitando una compressione alla base del dito.

Queste lesioni sono il paradigma di come la conoscenza delle complicanze e dei loro sintomi sia fondamentale per una corretta presa in carico dei pazienti. Molto spesso chi ha sviluppato tumori dei glomi ha alle spalle anni di complessi iter diagnostici strumentali e di inutili terapie mediche (antidolorifici, antidepressivi, antinfiammatori…). Tuttavia i sintomi sono talmente specifici e tipici, che la diagnosi clinica è immediata e quasi di certezza, anche se deve essere accompagnata dalla diagnostica per immagini (radiografia, ecografia, e risonanza magnetica nucleare, in alcuni casi) per la precisa localizzazione delle lesioni. La terapia è chirurgica e usualmente risolutiva sui sintomi (14).

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare tutti i colleghi dell'IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico di Milano che da anni collaborano nella diagnosi e follow up dei pazienti affetti da NF1; i colleghi dell'Istituto Neurologico C. Besta, UO Neuro-Oncologia Molecolare, dell'Istituto dei Tumori di Milano, UO Chirurgia Sarcomi e UO Oncologia Medica Tumori Mesenchimali dell'Adulto e Tumori Rari, e i colleghi dell'Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale. Infine un ringraziamento particolare all'ANF Associazione Neurofibromatosi Onlus.

Bibliografia

1. Kayes LM, Burke W, Riccardi VM, et al. Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients. Am J Hum Genet. 1994; 54:424-36.
2. Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, et al. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. Am J Hum Genet. 2007;80:140-51.
3. Pinna V, Lanari V, Daniele P, et al. p.Arg-1809Cys substitution in neurofibromin is associated with a distinctive NF1 phenotype without neurofibromas. Eur J Hum Genet. 2015; 23:1068–71.
4. Patil S, Chamberlain RS. Neoplasms associated with germline and somatic NF1 gene mutations. Oncologist. 2012;17:101-16.
5. Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM. Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. Am J Hum Genet. 2001; 68:1110-8.
6. Gutmann DH, Ferner RE, Listernick RH, et al. Neurofibromatosis type 1. Nat Rev Dis Primers. 2017; 23;3:17004.
7. Listernick R, Louis DN, Packer RJ, et al. Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force. Ann Neurol. 1997;41:143-9.
8. Shamji MF, Benoit BG. Syndromic and sporadic pediatric optic pathway gliomas: review of clinical and histopathological differences and treatment implications. Neurosurg Focus. 2007;23(5):E3.
9. Ueoka DI, Nogueira J, Campos JC, et al. Brainstem gliomas-retrospective analysis of 86 patients. J Neurol Sci. 2009;281(1-2):20-3.
10. Evans DG, Baser ME, McGaughran J, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. J Med Genet. 2002;39(5):311-4.
11. Ferner RE, O'Doherty MJ. Neurofibroma and schwannoma. Curr Opin Neurol. 2002. 15(6):679-84.
12. Sharif S, Moran A, Huson SM, et al. Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening. J Med Genet. 2007; 44(8):481-4.
13. Brems H, Park C, Maertens O, et al. Glomus tumors in neurofibromatosis type 1: genetic, functional, and clinical evidence of a novel association. Cancer Res. 2009; 15;69(18):7393-401.
14. Morey VM, Garg B, Kotwal PP. Glomus tumours of the hand: Review of literature. J Clin Orthop Trauma. 2016; 7(4):286-291.



Screening neonatale esteso delle malattie rare e prevenzione di una carenza vitaminica



Rossella Parini
Consulente medico-scientifico per la Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma, Clinica Pediatrica, Università Milano Bicocca, Monza

Ha fatto un certo scalpore la notizia pubblicata su OMAR (Osservatorio Malattie Rare) dell'1 marzo 2018 a firma di Francesco Fuggetta e ripresa dai principali quotidiani il 2 marzo e nei giorni seguenti, che lo screening neonatale esteso per le malattie rare, in vigore per legge dal 2016 (legge Taverna) ha permesso di identificare un rilevante numero di neonati carenti di vitamina B12 per deficit materno.

L'aspetto più preoccupante per la salute pubblica è che l'incidenza di questa condizione è aumentata sensibilmente da un anno all'altro: nel 2015 sono stati identificati 43 neonati su 243.092 screenati con una incidenza di 1:5.653 e nel 2016 i neonati carenti sono stati 126 su 253.124 con una incidenza nazionale di 1:2.008. Come risulta dal rapporto tecnico SIMMESN (Società Italiana per lo Studio delle Malattie Metaboliche e dello Screening Neonatale) (1), le regioni più interessate a questo fenomeno sono state Lombardia (56 casi: 42.491= 1: 759) ed Emilia Romagna (37 casi: 35.696 = 1: 965). Un certo numero di casi si è avuto anche in Toscana, ma con una incidenza poco più alta della media nazionale (15:34.684 = 1:2.300). Pochi casi sono stati identificati nelle altre regioni. Di questi risultati italiani si era già parlato a congressi nazionali o regionali nel 2013 e nel 2015 (SIMMESN-SINGEPED 2013, SIMMESN 2015, Scietà italiana di Neonatologia sezione lombarda, 2016) e il gruppo della Campania aveva pubblicato i dati regionali già nel 2014 con una incidenza di 1:5.000 (2). In tutte queste segnalazioni l'incidenza in Italia risulta molto diversa da quelle di un altro paese europeo (Ungheria) e degli Stati Uniti che hanno un'incidenza da 20 a 50 volte inferiore (3,4,5). Non sono disponibili altri dati in letteratura che riguardino altri paesi europei, soprattutto perché in molti di essi, come ad esempio UK, Francia, Svezia e Germania, lo screening neonatale è limitato ad alcune patologie e non identifica il deficit di B12.

Lo screening neonatale esteso delle malattie rare ha inaspettatamente identificato in Italia un aumento del numero di neonati carenti di B12 per deficit materno, con picchi in Lombardia ed Emilia Romagna

Questa che si sta verificando in Italia è una situazione discretamente inaspettata e alla quale bisogna trovare il modo di far fronte. Può anche essere che questa differenza con gli altri Paesi sia da attribuire in parte ai diversi cut-off utilizzati nello screening. Indipendentemente da ciò quello che bisogna cercare di capire è se questi neonati identificati allo screening hanno o no una buona probabilità di diventare sintomatici nei mesi successivi nel caso non siano trattati. In altre parole,

il nostro intervento su questi bambini è utile? Se lo è, come possiamo pensare di prevenire il deficit di B12 del neonato?
Cominciamo a rispondere a qualche domanda che sorge spontanea.

Perché lo screening per le malattie rare identifica il neonato carente di B12?
Quando allo screening neonatale esteso si trova un aumento di C3 (propionilcarnitina), questo conduce direttamente al dosaggio dell'acido metilmalonico (MMA) che è il marker di alcune malattie rare come l'acidemia metilmalonica da deficit di mutasi o altri difetti del metabolismo della cobalamina (6).

Nel sospetto di carenza di B12, oltre al dosaggio della vitamina nel plasma è consigliabile dosare i metaboliti espressione del deficit funzionale, MMA e omocisteina

L'MMA è anche un marker, probabilmente il più sensibile e significativo del deficit di B12 (6). Paradossalmente, il dosaggio della vitamina B12 nel sangue non è invece così sensibile a causa di alcuni motivi insiti nella tecnica di dosaggio: sebbene livelli estremamente bassi (<150 pg/ml) indichino sempre un deficit, molti soggetti che hanno valori di B12 all'interno dei range considerati "di norma" presentano un MMA elevato, il che è indice di carenza intracellulare di B12. Viene detto da più parti che i range di normalità devono essere modificati utilizzando come popolazione normale di riferimento solo quella che ha normali livelli di MMA (6,7). Inoltre il dosaggio della B12 nel plasma comprende sia la forma attiva legata alla transcobalamina II, che quella inattiva legata alla aptocorrina (transcobalamina I), proteina di cui non si conosce ancora bene la funzione. Le due forme possono avere un rapporto variabile anche se sembra che la forma attiva sia circa il 20% della totale. Sarebbe quindi meglio poter dosare solo la B12 legata alla transcobalamina II (7).
La vitamina B12 è il cofattore di due enzimi: metilmalonil-CoA mutasi e metionina sintasi. Gli indicatori di carenza funzionale intracellulare della B12 sono il MMA che si accumula perché non è processato dalla mutasi e l'omocisteina che aumenta per la mancata trasformazione in metionina ad opera della sintasi (6). Quindi, in conclusione, nel sospetto di carenza di B12, oltre al dosaggio della vitamina nel plasma che comporta alcune difficoltà di interpretazione, è consigliabile dosare i metaboliti che sono espressione del deficit funzionale (MMA e omocisteina); nella pratica clinica l'omocisteina è più accessibile del MMA, anche se meno specifica perchè si alza anche per carenza di folati.

Quali neonati sono a rischio di carenza di B12? Questa carenza di B12 che viene identificata nel neonato con lo screening è un vero deficit o no? Rischiamo di supplementare di B12 bambini e mamme che starebbero comunque bene anche senza questo intervento?
La necessità di vitamina B12 è, secondo le RDA (Recommended Dietary Allowances), 2.4 µg/die, ma soggetti che ne assumono di più (4-7µg/die) hanno valori di MMA plasmatico più bassi (6). In un soggetto sano con dieta onnivora, l'introduzione di B12 è di solito sufficiente. La vitamina B12 ha un ruolo nella sintesi del DNA e la sua carenza è responsabile di una serie di disturbi (6) dei quali i più evidenti sono una macrocitosi, con o senza anemia e disturbi neurologici che nell'adulto possono essere parestesie, atassia, ipo/iperreflessia, perdita della sensibilità cutanea, debolezza muscolare, cambiamenti di umore, irritabilità, depressione, insonnia, difetti cognitivi, tetraparesi. I lattanti con deficit di B12 sono generalmente portati all'attenzione clinica quando hanno un deterioramento neurologico acuto, spesso innescato da una malattia intercorrente, con regressione neuromotoria e profonda apatia, tremori e movimenti afinalistici erratici. Questi segni sono in genere preceduti da un periodo di alcuni mesi in cui si sono presentati in modo insidioso ipotonia, letargia, suzione debole, rifiuto dello svezzamento, ritardo di accrescimento e dello sviluppo neuromotorio.
In questo stadio i segni clinici correlano con danni cerebrali evidenti sostanzialmente riferibili ad

atrofia cerebrale (8,9). La prognosi a lungo termine sembra dipenda dalla gravità dei sintomi e da quanto è durata la carenza prima della introduzione di B12 (8,9). Nel nostro emisfero la causa più frequente di deficit di B12 è la gastrite atrofica autoimmune: questi pazienti producono anticorpi anti-mucosa gastrica e/o anti-fattore intrinseco e hanno bisogno di una supplementazione continuativa intramuscolare di vitamina B12: si è infatti visto che se il farmaco veniva sospeso alla risoluzione clinica, i segni clinici neurologici si ripresentavano già dopo circa 6 mesi mentre l'anemia macrocitica invece più tardi, dopo anni (6).

Neonati a rischio sono quindi in primo luogo i figli di madri che hanno atrofia gastrica autoimmune, spesso asintomatica e che si manifesta in giovani donne in apparente buona salute, ed è frequentemente associata a tiroidite autoimmune (6). Analogamente sono a rischio i neonati di madri che hanno qualunque altro problema di assorbimento gastrointestinale della vitamina B12: malattia di Crohn, sindrome di Zollinger-Ellison, malattia celiaca non riconosciuta, pregresso bypass gastrico, infezione da Helicobacter pylori, parassitosi intestinali, assunzione prolungata di inibitori della pompa protonica e qualunque altra situazione che possa interferire con l'assorbimento intestinale della B12 (6).

Un'altra condizione che determina una scarsa introduzione di B12 è la dieta vegana e, in misura minore, vegetariana. Sono stati pubblicati centinaia di articoli su questo argomento che riguardano persone che assumono una dieta completamente priva o con una piccola percentuale di alimenti di origine animale, per scelta culturale/religiosa, o per grave difficoltà economica come in Turchia e in India (9,10,11).

Cercando sul web, si trovano nel mondo vegano sia posizioni contrarie alla supplementazione con B12 in vegani e vegetariani, sia posizioni che ne riconoscono la necessità (http://ildragoparlante.com; https://scienzavegetariana.it).

I dati disponibili finora, pubblicati o presentati a congressi, dimostrano che effettivamente la maggior parte dei neonati screenati aveva una carenza vera di B12 documentata sia dai valori plasmatici di B12 sotto il range o ai livelli inferiori del range di norma, sia dall'omocisteina plasmatica e/o MMA elevati che si riducevano dopo somministrazione di B12.

Quanti di questi neonati sarebbero diventati sintomatici se non trattati alla nascita?

Abbiamo visto negli anni alcuni lattanti, ricoverati in ospedale tra i 6 e i 13 mesi di vita perché affetti in maniera conclamata, sempre allattati esclusivamente al seno per difficoltà irrisolte allo svezzamento, con atrofia cerebrale e danni neurologici che non si sono sempre risolti completamente nel follow-up a lungo termine (9,12,13). Purtroppo non è possibile, per difficoltà di codificazione diagnostica, conoscere il numero esatto di bambini ricoverati negli anni scorsi in Italia per deficit di B12. Certamente è verosimile che non tutti i neonati carenti di B12 alla nascita e identificati e trattati allo screening avrebbero sviluppato un deficit conclamato nei primi mesi di vita se non trattati.

E' ragionevole pensare che una parte di questi neonati avrebbe potuto superare il deficit se alimentati dalla nascita con latte artificiale ed un'altra parte avrebbe potuto mantenersi senza sintomi acuti con un deficit borderline di B12, causa non riconosciuta di qualche difficoltà di alimentazione e scarso accrescimento, di qualche alterazione comportamentale o di un lieve deficit cognitivo, sintomi questi molto difficilmente attribuibili ad un sospetto deficit di B12.

Neonati a rischio di carenza di B12 sono i figli di madri con atrofia gastrica autoimmune, spesso asintomatica ed associata a tiroidite autoimmune, o con problemi di assorbimento gastrointestinale della vitamina B12 e i figli di madri vegane o vegetariane

Possiamo pensare che in questo modo abbiamo riconosciuto tutti i casi di deficit di vitamina B12 materna?

Come spiegano i responsabili dei laboratori di screening, questo è un incidental finding, nel senso che il deficit di B12 non è tra le malattie che devono essere screenate e non ci si preoccupa quindi di verificare che siano identificati tutti i casi.

Considerando che i valori di cut-off allo screening neonatale per l'acido metilmalonico delle varie regioni italiane sono circa 1.000-1.500 nmol/L o superiori, mentre per il sospetto di deficit di B12 ci si basa su valori >400 nmol/L (6), si può pensare che una parte di neonati carenti (probabilmente i meno gravi) non sono riconosciuti e che in realtà siamo davanti alla punta di un iceberg.

Come possiamo affrontare questa situazione? L'esperienza fatta con l'acido folico può essere d'aiuto?

Negli anni scorsi abbiamo visto un grosso impegno da parte di tutti gli attori in campo, società scientifiche, Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute nel promuovere la somministrazione pre-concezionale e nei primi due trimestri di gravidanza dell'acido folico per la prevenzione dei difetti del tubo neurale (www.iss.it>CNMR; www.salute.gov.it) (14). Il deficit di acido folico è causato dalla scarsa introduzione nella dieta di frutta e verdura. Oltre a raccomandare alle giovani donne fertili di assumere molti vegetali preferibilmente crudi, è apparso molto più semplice raccomandare anche a tutte l'assunzione di una compressa di folati piuttosto che dosare l'acido folico nel sangue e somministrarlo solo a chi fosse carente. Potremmo fare lo stesso con la B12?

La vit. B12 per os con l'acido folico a tutte le donne durante gravidanza ed allattamento consentirebbe di identificare con lo screening neonatale solo i soggetti ancora carenti nonostante la profilassi, rendendo possibile diagnosi e trattamento di madri e figli

Purtroppo la storia della B12 è più complicata, come abbiamo visto. Innanzitutto siamo di fronte a due diverse popolazioni con una consistenza numerica probabilmente simile: una che ha la B12 bassa perché non la introduce con gli alimenti, l'altra che ha disturbi di assorbimento intestinale della B12 e deve essere riconosciuta e trattata a vita con somministrazioni intramuscolari di B12 a dosi elevate (6). Inoltre, ammesso che invece tutte le gravide siano sottoposte ad un prelievo per i livelli di B12, abbiamo visto che il dosaggio della B12 nel sangue, con i range di normalità attualmente adottati, non identifica tutti i soggetti carenti e può dare falsi negativi. Il marker più sensibile è MMA, che però è dosato solo nei laboratori per malattie metaboliche. Anche il dosaggio della transcobalamina II non è attuato routinariamente. Non è pensabile di utilizzare l'esame emocromocitometrico perché l'anemia macrocitica si manifesta tardivamente (6).

La prevenzione del deficit di B12 nel neonato non è dunque completamente attuabile somministrando per profilassi B12 per os a tutte le gravide; non è neppure ragionevolmente fattibile un monitoraggio della B12 plasmatica in tutte le gravide, cosa che oltretutto esporrebbe alle difficoltà interpretative dette sopra e al rischio di interpretare come normale un valore borderline che potrebbe nascondere una carenza.

Abbiamo però lo strumento dello screening neonatale già in atto, che non è partito con questo scopo, ma che a questo punto potrebbe essere considerato come l'ultimo tassello che mancava alla protezione dalla carenza di B12 della coppia madre-bambino. Si può dunque ipotizzare di somministrare per profilassi a tutte le gravide la vitamina B12 per os insieme all'acido folico, mantenendo l'assunzione per tutta la gravidanza e durante l'allattamento; lo screening neonatale esteso identificherà poi i neonati ancora carenti nonostante la profilassi, che dovrebbero essere prevalentemente i figli di madri con disturbi di assorbimento intestinale. Sia la madre che il neonato avranno perciò la possibilità di essere diagnosticati e trattati.

Dunque, in conclusione, il riconoscimento del deficit materno di B12 è ora in effetti un incidental finding dello screening neonatale perché è un reperto occasionale e non sappiamo se identifichi tutti i neonati carenti, ma è diventato al tempo stesso una tappa essenziale sulla strada della prevenzione dei danni da deficit di B12 nella coppia madre-bambino.

Questo valore aggiunto dello screening neonatale in termini di salute pubblica dovrebbe esser quantificato e valorizzato: non solo può prevenire i sintomi e le loro conseguenze cliniche disastrose nei bambini, ma anche permette di curare le madri con gastrite atrofica non riconosciuta o parassitosi intestinali o altri disturbi di assorbimento passati inosservati.

Bibliografia

1. https://www.simmesn.it/it/archivio-documenti/rapporti-tecnici-screening-neonatale.html
2. Scolamiero E, Villani GRD, Ingenito L, et al. Maternal vitamin B12 deficiency detected in expanded newborn screening. Clinical Biochemistry 2014; 47: 312–317.
3. Papp F, Rácz G, Lénárt I, et al. Maternal and neonatal vitamin B12 deficiency detected by expanded newborn screening. Orv Hetil. 2017; 158(48): 1909–1918.
4. Hinton CF, Ojodu JA, Fernhoff PM, et al. Maternal and neonatal vitamin B12 deficiency detected through expanded newborn screening — United States. 2003–2007. J Pediatr 2010;157:162–3.
5. Sarafoglou K, Rodgers J, Hietala A, et al. Expanded newborn screening for detection of vitamin B12 deficiency. JAMA 2011;305(12):1198–200.
6. Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. N Eng J Med 2013; 368:149–60.
7. Herrmann W, Obeid R. Utility and limitations of biochemical markers of vitamin B12 deficiency. Eur J Clin Invest. 2013; 43(3):231-7.
8. Codazzi D, Sala F, Parini R, Langer M. Coma and respiratory failure in a child with severe vitamin B12 deficiency. Pediatr Crit Care Med 2005; 6:483–485.
9. Goraya JS, Kaur S, and Mehra B. Neurology of Nutritional Vitamin B Deficiency in Infants: Case Series From India and Literature Review. Journal of Child Neurology 2015; 30(13): 1831-1837.
10. Pawlak R, Lester SE and Babatunde T. The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: a review of literature. European Journal of Clinical Nutrition 2014; 68: 541–548.
11. Balcı YI, Ergin A, Karabulut A, et al.Serum Vitamin B12 and Folate Concentrations and the Effect of the Mediterranean Diet on Vulnerable Populations. Pediatric Hematology and Oncology 2014; 31: 62-67. 19
12. Guez S, Chiarelli G, Menni F, et al. Severe vitamin B12 deficiency in an exclusively breastfed 5-month-old Italian infant born to a mother receiving multivitamin supplementation during pregnancy. BMC Pediatrics 2012;12: 85.
13. Galimberti C, Gasperini S, Molinari S, et al. La carenza di vitamina B12 nel lattante: 6 casi in 5 anni all'Ospedale San Gerardo di Monza. Atti VII congresso Nazionale SIMMESN, Firenze 16-18 dicembre 2015.
14. Marangoni F, Cetin I, Verduci E, et al. Maternal diet and nutrient requirements in pregnancy and breastfeeding. An Italian Consensus Document. Nutrients 2016;8(10):629.



Malattie rare.
Perchè per noi ogni paziente è unico.

Grazie ad una ricerca scientifica all'avanguardia, **Amicus Therapeutics** rappresenta oggi una realtà importante nel panorama delle società operanti nel settore delle biotecnologie.

Amicus Therapeutics sviluppa infatti terapie innovative per il trattamento delle malattie rare.

L'attenzione che poniamo quotidianamente ai nostri pazienti si riflette nell'impegno profuso nell'individuare trattamenti mirati e nella volontà, da parte dell'azienda, di collaborare fattivamente con le associazioni pazienti e con i caregivers per assicurare il massimo sostegno possibile nell'affrontare la malattia.

AMC/NP/002/MAG17

Amicus Therapeutics®

www.amicusrx.it

IL VALORE DELLA RICERCA, L'ATTENZIONE PER I PAZIENTI.



Colestasi intraepatiche progressive familiari



Barbara Parma[1], Silvia Tajè[1], Alessandra Di Cesare Merlone[1], Luisa Abbagnato[1], Emanuele Nicastro[4], Vera Quadri[4], Aurelio Sonzogni[2] Maria Iascone[3], Lorenzo D'Antiga[4], Angelo Selicorni[1]
[1]Unità Operativa Complessa di Pediatria ASST Lariana Como; [2]Unità di Anatomia Patologica, ASST Papa Giovanni XXIII Bergamo; [3]Laboratorio di Genetica Molecolare - USSD LGM ASST Papa Giovanni XXIII Bergamo; [4]Unità Operativa Complessa di Pediatria, ASST Papa Giovanni XXIII Bergamo

N.A., femmina, 6 mesi, viene condotta presso il Pronto Soccorso del nostro Centro per ittero associato ad arresto della crescita ponderale. Si segnalano feci incostantemente ipo-acoliche (Fig. 1). Anamnesi perinatale: nata in Lombardia, alla 38ª s.g., LBW e SGA. Esegue in TIN ecografia cerebrale ed ABR, risultate nei limiti. Profilo glicemico nella norma. Ittero neonatale con componente diretta non significativa (bilirubina tot. 16.9, diretta 2.14 mg/dl), nella norma transaminasi e restanti indici di colestasi. Sierologia materna negativa per infezioni durante la gestazione. Si segnala: genitori CONSANGUINEI.

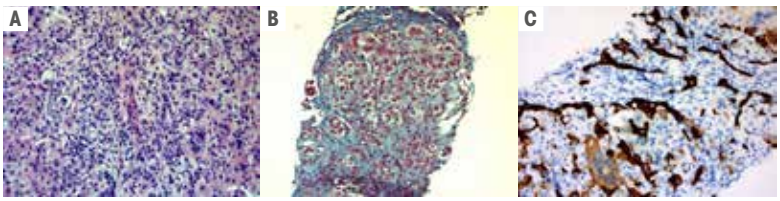
Fig. 1



Feci ipo-acoliche del nostro caso clinico

All'arrivo si presenta in condizioni generali discrete, non note dismorfiche. Cute itterica, indenne da lesioni. Addome con epatosplenomegalia, margine epatico all'ombelicale trasversa. Distrofica. Gli esami evidenziano ipertransaminasemia con ittero colestatico, in assenza di rialzo di GGT (AST/ALT 508/357 U/L, bil. 9,05 mg/dL, dir. 7,02. ALP 590 U/L, GGT 33 UI/L). Indici di sintesi epatica nei limiti, coagulazione nella norma.
Viene ricoverata per accertamenti: in particolare si evidenziano acidi biliari ed alfafetoproteina elevati. Nella norma gli accertamenti metabolici ed alfa 1 antitripsina. Esegue ecocardiogramma e visita oculistica risultate nella norma. L'ecografia addome evidenzia fegato aumentato a struttura omogenea. Colecisti nella norma, non dilatate le vie biliari.
Come trattamento si esegue Vit K im 10 mg; intraprende vitamine liposolubili (ADEK) ed acido ursodesossicolico 30 mg/kg die (UDCA) per os. Si imposta una nutrizione con latte ad alta componente di MCT e viene introdotto olio MCT come condimento nelle pappe. Per prurito viene impostata terapia dapprima con cetirizina gtt quindi rifampicina. Viene inviata presso Centro di Epatologia Pediatrica per completare gli accertamenti nel forte sospetto di forma di colestasi intraepatica progressiva familiare (PFIC) a GGT normali. Esegue biopsia epatica e l'esame istologico (Fig. 2) evidenzia cirrosi diffusa incompleta con trasformazione giganto-cellulare degli epatociti e bilirubinostasi.

Fig. 2 **Istologia della paziente descritta**



A (Ematossilina ed eosina): colestasi, flogosi e proliferazione duttulare;
B (Tricromica): nodulo di cirrosi; **C** (Citocheratina 7): severa metaplasia biliare

L'esame genetico evidenzia una nuova mutazione (p.Gly386ter) in omozigosi del gene ABCB11 codificante per la proteina BSEP (Bile Salt Export Pump), ponendo diagnosi di PFIC 2.

Le colestasi intraepatiche progressive familiari

Le PFIC appartengono a un gruppo eterogeneo di patologie autosomiche recessive che compromettono la formazione della bile e si manifestano con colestasi di origine epatocellulare (1). L'incidenza è stimata tra 1/50.000 e 1/100.000 nascite e costituiscono il 10-15% delle colestasi neonatali. Sono stati identificati 3 principali tipi di PFIC: PFIC 1, PFIC 2 e PFIC3.

Sono state inoltre recentemente descritte in letteratura due ulteriori forme di PFIC: PFIC 4 e 5, a seguito della recente identificazione di nuovi geni causali colestasi intraepatica progressiva.

Sia PFIC1 (602397 OMIM) che PFIC2 (601847 OMIM) sono causate dalla compromissione della secrezione biliare di elettroliti dovuta rispettivamente alle mutazioni in ATP8B1, codificante la proteina FIC1, e ABCB11, codificante la pompa proteica di escrezione dei sali biliari. Le alterazioni di ABCB4 compromettono la secrezione dei fosfolipidi biliari e causano invece PFIC3 (1-2).

La forma chiamata PFIC4 (615878 OMIM) viene causata da una mutazione in omozigosi o in eterozigosi composta del gene TJP2 mappato sul cromosoma 9q21. Il gene TJP2 codifica per la proteina 2 delle tight junction (chiamata anche zona occludens 2), che non è un trasportatore, ma ha un ruolo nell'organizzazione delle giunzioni intercellulari epiteliali ed endoteliali che, nel fegato, separano la bile dal plasma (4-10).

Infine la recente forma denominata PFIC 5 (617049 OMIM) è dovuta a mutazioni in omozigosi a livello del gene NR1H4 sul braccio lungo del cromosoma 12, che codifica il recettore nucleare FXR dell'acido biliare (5-10).

Le PFIC appartengono a un gruppo eterogeneo di patologie autosomiche recessive che compromettono la formazione della bile e si manifestano con colestasi di origine epatocellulare

Clinica

La manifestazione clinica comune delle PFIC è rappresentata da colestasi. Nelle colestasi intraepatiche è possibile una decolorazione transitoria delle feci in particolare nelle prime fasi di malattia (Fig. 1). PFIC1, di solito, si manifesta nei primi mesi di vita ed è caratterizzata da ittero colestatico, che diventa ingravescente nel corso della malattia. In caso di PFIC2, la presentazione iniziale e l'evoluzione stessa sembrano essere più gravi, con ittero colestatico permanente dai primi mesi di vita e rapida comparsa di insufficienza epatica nei primi anni di vita. Un grave prurito accomuna pazienti con PFIC1 e PFIC2 (1).

Fenotipicamente, pertanto, PFIC1 e PFIC2 sono simili, ma è da segnalare come le caratteristiche extraepatiche che sono state riportate in pazienti PFIC1 (persistente bassa statura, sordità neurosensoriale, diarrea acquosa, pancreatite, elevata concentrazione di elettroliti nel sudore (Cl), steatosi epatica), non sono state descritte in PFIC2 (2).

Questi bambini presentano inoltre un alto rischio di sviluppo di carcinoma epatocellulare ad esordio molto precoce in PFIC2 (anche in età inferiore all'anno di vita) con cirrosi e conseguente insufficienza epatica. Neoplasie epatiche non sono al momento state riportate in associazione con PFIC1. PFIC3 presenta, invece, esordio più tardivo, raramente in età neonatale ed in un terzo dei casi nel primo anno di vita. Può infatti presentarsi più tardivamente durante la prima-seconda infanzia sino ad età giovane e adulta. Il sanguinamento gastrointestinale secondario a varici esofagee da ipertensione portale e la cirrosi sono spesso i sintomi di presentazione in pazienti adolescenti o giovani adulti. Il prurito è generalmente moderato rispetto alle altre due forme. L'evoluzione è caratterizzata da colestasi cronica itterica o anitterica, ipertensione portale e successiva insufficienza epatica; vi è inoltre, anche in PFIC3, la possibilità di degenerazione in neoplasia epatica (2-3).

In merito alle forme recentemente descritte in letteratura, PFIC 4 si presenta fenotipicamente come PFIC 1-2 (4-10) ed è anch'essa caratterizzata da un rischio in degenerazione tumorale molto precoce.

Infine la forma PFIC 5, dalla esigua casistica descritta al momento, ha esordio molto precoce e gravità di presentazione clinica. Sono, infatti, descritti esordi

Tab. 1 **Caratteristiche principali delle PFIC**

	PFIC 1	PFIC 2	PFIC 3	PFIC 4	PFIC 5
Età di esordio	infanzia	periodo neonatale-prima infanzia	seconda infanzia (30% circa), giovane età adulta	infanzia	periodo fetale-neonatale
Età insufficienza epatica	prima decade	rapida, primi anni di vita	prima/seconda decade	infanzia	rapida, primi anni di vita
Decorso malattia	moderatamente severo	severo	insidioso	progressivo	severo
Trasmissione	autosomica recessiva	autosomica recessiva	autosomica recessiva	autosomica recessiva	autosomica recessiva
Prurito	severo	molto severo	moderato		
GGT sieriche	normali	normali	alte	normali, modicamente alterate	normali
Proliferazione dotti	assente	assente	presente		
Concentrazione acidi biliari sierici	molto alta	molto alta	alta		
Composizione della bile	concentrazione bassa di acidi biliari (3-8mM)	concentrazione molto bassa di acidi biliari (<1mM)	concentrazione di fosfolipidi bassa		
Rischio di calcoli di colesterolo	assente	aumentato	aumentato		
Locus cromosomico	18q21.31	2q31.1	7q21	9q21.11	12q23.1
Gene/proteina	ATP8B1 FIC1	ABCBI 1 BSEP	ABCB4 MDR3	TJP2 ZO2	NR1H4 FXR
Collocazione sull'epatocita	membrana canalicolare	membrana canalicolare	membrana canalicolare	tigh junctions	membrana canalicolare
Altri siti di espressione	colangiociti, intestino,pancreas	nessuno	nessuno		
Istologia	blanda colestasi, lieve fibrosi lobulare	colestasi, epatite gigantocellulare, necrosi epatocellulare, fibrosi portale	proliferazione dei dotti biliari, infiltrato infiammatorio e fibrosi biliare	tight junctions allungate tra epatociti e canalicoli biliari	colestasi intralobulare, trasformazione gigantocellulare, reazione duttulare, BSEP non riscontrabile nei canalicoli biliari
Rischio tumorale	No	Si (alto e precoce)	Si (modesto)	Si (alto e precoce)	
Difetto funzionale	trasporto aminofosfolipidi ATP-dipendente	trasporto acidi biliari nella bile ATP-dipendente	traslocazione nella bile di fosfatidilcolina ATP-dipendente	connessione intercellulare: tight junctions allungate tra epatociti e canalicoli biliari	a livello del recettore nucleare dell'acido biliare FXR

neonatali con possibili quadri di ascite; presenta, anche nei casi meno gravi all'esordio, una evoluzione rapidamente progressiva ed una prognosi severa che porta a decesso se i pazienti non vengono rapidamente sottoposti a trapianto di fegato (5-10). Riportiamo nella tabella 1 le caratteristiche ad oggi note dei 5 tipi di PFIC.

Diagnosi

Esami di laboratorio: le PFIC 1 e PFIC 2 si caratterizzano per acidi biliari elevati nel sangue (responsabili del prurito che le accomuna clinicamente) e bassi nella bile, con livelli di GGT normali. Quest'ultimo è un dato peculiare e diagnostico in pratica clinica.

L'esame istologico è di fondamentale importanza diagnostica, da eseguirsi in Centri Specializzati in Epatologia Pediatrica

Pertanto, il riscontro di valori costantemente normali dell'attività sierica di GGT identifica già con alta probabilità un gruppo di pazienti con una colestasi familiare progressiva (PFIC 1-2), senza investire in ulteriori accertamenti.
Nella PFIC 3 la diagnosi differenziale è, invece, più complessa e gli esami ematochimici sono meno indicativi; sono infatti elevati sia gli acidi biliari che le GGT, perché la mancata escrezione della fosfatidilcolina espone il canalicolo all'effetto detergente dei sali biliari. Si pongono pertanto in diagnosi differenziale con le altre cause di ittero colestatico (6-7).
PFIC4 si manifesta, anche in merito ad esami di laboratorio, analogamente a PFIC 1-2, con colestasi a GGT normali o lievemente elevate (4-10).
Infine, dalle recenti descrizioni di casi clinici con forma PFIC 5 si evidenzia una forma colestatica a GGT basse o normali. E' caratterizzata da una precoce e severa coaugulopatia, vit K indipendente, con iperammoniemia. In un solo caso viene descritta elevazione degli acidi biliari sierici (5-10).

Ecografia addome: viene eseguita tra gli accertamenti di primo livello per escludere una malattia delle vie biliari. Quali informazioni aspettarsi nelle PFIC? In genere, l'ecografia è normale, non vi sono alterazioni dell'albero biliare, ma si possono evidenziare una colecisti di dimensioni ingrandite o calcoli della colecisti (in PFIC 2-3) (2).

Esame istologico: è un esame di fondamentale importanza diagnostica da eseguirsi, per una corretta lettura dello stesso, in Centri Specializzati in Epatologia Pediatrica. Nei pazienti PFIC1 l'istologia epatica è caratterizzata da colestasi canalicolare con assenza di una vera proliferazione duttulare, con metaplasia biliare degli epatociti solo periportale. Nei pazienti PFIC2 si vedono gli stessi segni, ma l'architettura del fegato è più alterata, con fibrosi ed infiammazione portale e lobulare più pronunciate. La necrosi epatocellulare e la trasformazione gigantocellulare sono molto più pronunciate in PFIC2 che in PFIC1 e possono persistere nel tempo. Queste differenze tra PFIC1 e PFIC2 probabilmente riflettono le gravi lesioni lobulari presenti in PFIC2.
Infine in PFIC3, l'istologia epatica evidenzia fibrosi portale ed una vera proliferazione duttulare con infiltrato infiammatorio misto. In alcuni casi, è presente colestasi nel lobulo e in alcuni dotti contenenti trombi biliari.
Se si dispone di un campione di bile, una marcata riduzione della concentrazione dei sali biliari o di fosfolipidi sarà rispettivamente suggestiva di PFIC 1-2 e di PFIC 3 (Tab. 1) (7-8).
L'esame istologico di PFIC4 evidenzia in modo peculiare tight junctions allungate tra gli epatociti e i canalicoli biliari.
Il quadro di PFIC 5 è, infine, anch'esso caratterizzato da colestasi intralobulare, trasformazione gigantocellulare, ballooning degli epatociti e reazione duttulare. L'analisi immunoistochimica non rende evidenziabile BSEP (ABCB11), gene target di NR1H4, nei canalicoli biliari (5-10).

Analisi molecolari: In passato i singoli geni venivano analizzati uno alla volta mediante sequenziamento Sanger. Attualmente l'analisi si basa sull'uso delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) e tutti i geni vengono analizzati in contemporanea (pannelli genomici per colestasi genetiche).

Trattamento

La terapia medica è la prima linea di trattamento in tutti i pazienti con PFIC. Gli obiettivi della terapia sono cercare di ridurre l'evoluzione della malattia,

La terapia medica è il trattamento di prima linea per tutte le PFIC per ridurre l'evoluzione della malattia, alleviare il prurito, correggere l'ipovitaminosi, il deficit di sintesi e migliorare lo stato nutrizionale

alleviare il prurito, correggere ipovitaminosi e deficit di sintesi e migliorare lo stato nutrizionale. Primo step comune in tutte le PFIC è rappresentato dall'utilizzo di UDCA a dosaggio elevato (pari a 30 mg/kg/die in 2-3 dosi die), in grado parzialmente di ridurre il prurito ed il danno epatocellulare da colestasi.
Si rendono anche necessarie supplementazioni vitaminiche con vitamine liposolubili (A.D.E.K.) per os e/o intramuscolo (particolare importanza la somministrazione di Vit K) ad un dosaggio incrementato rispetto a quello suggerito per età.

E' fondamentale inoltre un corretto apporto nutrizionale, pari al 125% degli RDA raccomandati. Si rende in questi termini necessario incentrare la nutrizione su alimenti con grassi a media catena (MCT), ad esempio latte dedicato con MCT ed olio MCT come condimento, che non richiedono sali biliari per assorbimento e migliorano lo stato nutrizionale (8-9). Alcuni pazienti PFIC 1-2 possono giovarsi per migliorare colestasi e prurito dell'intervento chirurgico di diversione biliare parziale.
Il trapianto di fegato è tuttavia l'unica alternativa nel caso di fallimento delle terapie sopraindicate.

APPUNTI SINOTTICI SULLE PFIC

- *La PFIC appartiene ad un gruppo eterogeneo di patologie autosomiche recessive che compromettono la formazione della bile.*
- *La manifestazione clinica comune delle PFIC è rappresentata da colestasi. Nelle colestasi intraepatiche è possibile una decolorazione delle feci transitoria, in particolare nelle prime fasi di malattia.*
- *E' importante ricordare che feci ipo-acoliche sono sempre patologiche ed espressione di colestasi.*
- *Esami di laboratorio possono essere già diagnostici in caso di colestasi con valori di GGT nella norma ed acidi biliari elevati (PFIC 1-2). Più complessa è la diagnosi di PFIC3 caratterizzata da GGT e acidi biliari elevati. PFIC4 e PFIC 5, di recente descrizione, sono anch'esse caratterizzate da valori di GGT normali. Da segnalare l'evoluzione più severa di PFIC5 con grave e precoce coaugulopatia Vit K indipendente.*
- *La diagnosi viene completata da biopsia ed esami genetici.*
- *Il trattamento farmacologico dei pazienti con PFIC, oltre alla comune presa in carico delle colestasi croniche, si basa sull'acido ursodesossicolico (UDCA). In caso di scarsa risposta all'UDCA è possibile proporre una parziale diversione biliare esterna. In caso di insuccesso delle terapie e trattamenti riportati, il trapianto di fegato rimane l'unica alternativa.*

Bibliografia

1. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, et al. Progressive familial intrahepatic cholestasis. Orphanet J Rare Dis. 2009;4:1.
2. Srivastava A. Progressive familial intrahepatic cholestasis. J Clin Exp Hepatol. 2014;4(1):25-36.
3. Sun GR, Burns M. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis: A Rare Cause of Cirrhosis in Young Adult Patients. Case Rep Med. 2015;2015:428638.
4. Sambrotta M, et al. Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. Nat Genet. 2014;46(4):326-8.
5. Gomez-Ospina N, Potter CJ, Xiao R, et al. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. Nat Commun. 2016;18;7:10713.
6. Maggiore G, Caprai S. La diagnosi di ittero colestatico nel neonato. Medico e Bambino 3/1999.
7. Fawaz R, Baumann U, Ekong U, et al. Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Joint Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2017 Jan;64:154-168.
8. Massaro M, Benelli E, Pellegrin MC. Due colestasi a confronto. Medico e Bambino. Novembre 2014. 17:9.
9. Pellegrini Filippeschi I, Riva S, Sciveres M, et al. La colestasi familiare intraepatica progressiva: un modello di malattia del trasporto biliare. Giornale SIGENP. Vol. III – N° 2/2011.
10. https://www.omim.org



Citopenie immuno-mediate e sindrome di Kabuki



Silvia Cantoni
Struttura Complessa di Ematologia, Niguarda Cancer Center. ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

Caso clinico 1

Un giovane adulto di 29 anni con nota sindrome di Kabuki (SK), si presentava in pronto soccorso nell'ottobre 2013 a seguito alla comparsa di gemizio emorragico al cavo orale. L'esame emocromocitometrico mostrava piastrine 1 x 10^9/L, Hb 15,7 g/dL, leucociti 10,9 x 10^9/L; nessuna anomalia morfologica allo striscio di sangue periferico. Un emocromo eseguito nel maggio 2013 dimostrava piastrine ai limiti inferiori di norma, 153 x 10^9/L.

Veniva formulata la diagnosi di piastrinopenia immune (ITP), con anticorpi anti-piastrine positivi, confermata dalla normalità dell'aspirato midollare e del cariotipo; il paziente non presentava ipogammaglobulinemia o deficit di IgA.

Veniva iniziato il trattamento standard con desametasone 40 mg/die per 4 giorni consecutivi. In assenza di adeguata risposta con persistenza della diatesi emorragica muco-cutanea, il paziente iniziava un trattamento con prednisone 1 mg/kg/die associato alla somministrazione di immunoglobuline ad alte dosi. Il paziente veniva dimesso in giornata + 23 con una conta piastrinica stabilizzata >150 x 10^9/L. Il trattamento con prednisone veniva mantenuto nelle settimane successive con progressiva riduzione della posologia, fino a sospensione, con risposta mantenuta e in assenza di effetti collaterali.

La ITP associata a SK è una forma cronica, recidivante e poco responsiva ai corticosteroidi a causa della disfunzione immunologica associata alla sindrome

Nel marzo 2014 il paziente veniva ricoverato presso altro Centro per addominalgie persistenti con riscontro ecografico di infarti splenici multipli, la cui natura non riuscì ad essere identificata nonostante gli approfonditi accertamenti cui venne sottoposto.

Per l'elevato rischio di rottura splenica, il paziente veniva trasferito presso il nostro ospedale e sottoposto a splenectomia laparoscopica, previe vaccinazioni anti-pneumococco, meningococco e emofilo. Al momento dell'intervento la conta piastrinica era di 221 x 10^9/L.

Il decorso post-operatorio fu complicato dall'insorgenza di insufficienza respiratoria con addensamenti polmonari bilaterali, con necessità di supporto respiratorio non invasivo e prolungato trattamento antibiotico in assenza di isolamenti colturali. L'esame istologico della milza rivelò solo iperplasia della polpa bianca. Da allora il paziente è in follow up con piastrine stabili > 200 x 10^9/L, in assenza di complicanze.

Caso clinico 2

Un giovane adulto di 23 anni con nota diagnosi di SK si presentava al pronto soccorso nell'agosto 2015 per iperpiressia associata a diatesi emorragica muco-cutanea. L'emocromo dimostrava piastrine 7 x 10^9/L, leucociti 2,3 x10^9/L con una conta assoluta di neutrofili di 0,8 x 10^9/L, Hb 12,7 g/dL. Lo striscio di sangue periferico confermava la grave piastrinopenia e neutropenia, in assenza di cellule immature. L'aspirato midollare evidenziava iperplasia delle serie megacariocitaria e mieloide.

Veniva pertanto formulata la diagnosi di piastrinopenia e neutropenia immuno-mediata con positività degli anticorpi anti-piastrine e anti-neutrofili; il dosaggio delle immunoglobuline era nella norma. Per l'elevato rischio infettivo legato alla grave neutropenia sintomatica per febbre, il paziente veniva trattato con desametasone 20 mg/die per 4 giorni consecutivi. In giornata + 3 dall'inizio della terapia steroidea la conta piastrinica salì a 54 x 10^9/L e i neutrofili a 0,14 x 10^9/L. Il paziente venne dimesso in giornata + 7 con piastrine 182 x 10^9/L e neutrofili 1,2 x 10^9/L. Dopo la dimissione il paziente completò il trattamento con ulteriori 5 cicli di desametasone 20 mg/die per 4 giorni consecutivi ogni 3 settimane con ottenimento di risposta completa persistente sia sulla conta piastrinica che su quella dei neutrofili. Durante il trattamento non emersero complicanze infettive.

Dall'aprile 2016 si osservò un progressivo calo delle piastrine con franca recidiva di sola citopenia immunomediata (ITP) nel giugno 2016. Il ritrattamento con desametasone 40 mg/die per 4 giorni consecutivi per os risultò efficace nel normalizzare la conta piastrinica, ma non nello stabilizzarla, configurando una diagnosi di ITP steroide-dipendente (1).

Lo studio della cinetica piastrinica dimostrò una emivita ridotta di 6 giorni con captazione epato-splenica. Per il ricorrere di valori piastrinici inferiori a 20 x 10^9/L in corso di desametasone pulsato, il paziente venne vaccinato per pneumococco, emofilo e meningococco e, nel marzo 2017, venne sottoposto a splenectomia laparoscopica. In occasione dell'intervento chirurgico, venne eseguita una biopsia osteomidollare che confermò la diagnosi di ITP. Il decorso post-operatorio non fu complicato da eventi infettivi o emorragici.

Alla dimissione, la conta piastrinica era di 260 x 10^9/L e i valori si mantennero > a 200 x 10^9/L nei successivi 3 mesi. Dal giugno 2017 si osservò un progressivo calo dei conteggi piastrinici, con valori di neutrofili sempre nella norma. Al gennaio 2018, la conta piastrinica è pari a 40 x 10^9/L, in assenza di manifestazioni emorragiche. Il paziente mantiene un controllo mensile dell'emocromo e in presenza di recidiva post-splenectomia è candidato a trattamento con agonisti della trombopoietina.

Commento ai casi clinici

La sindrome di Kabuki, detta anche sindrome di Niikawa-Kuroki, è un raro disordine congenito correlato, nella maggior parte dei casi, a mutazioni a carico di due geni, KMT2D (histone-lysine

L'incremento del rischio infettivo della SK è reso evidente dalla grave complicanza polmonare manifestata dopo splenectomia nel primo caso clinico

Tab. 1 Sindrome di Kabuki: caratteristiche cliniche

- Ritardo di crescita post-natale
- Deficit intellettivo (circa 92% dei casi)
- Facies caratteristica (95% dei casi):
  - lunghe fessure palpebrali, lunghe ciglia, ptosi palpebrale
  - anomalie del lobo dell'orecchio
  - anomalie a carico della dentizione, ipodonzia
- Anomalie scheletriche, scoliosi, bassa statura, palatoschisi
- Ipotonia muscolare, lassità articolare
- Anomalie cardiache congenite (circa 50% dei casi)
- Anomalie renali congenite (rene a ferro di cavallo)
- Ipoacusia
- Epilessia
- Telarca precoce
- Tendenza all'obesità, soprattutto in età puberale

Desametasone ad alte dosi refratte è efficace e sicuro nel trattamento dell'ITP dell'adulto

N-methyltransferase 2D) e KDM6A (lysine-specific demethylase 6A) (2-4), entrambi coinvolti nella regolazione epigenetica del DNA.
Deve il suo nome alle peculiari caratteristiche facciali cui si associa, che ricordano il make up degli attori del Kabuki, una forma di teatro tradizionale giapponese. Clinicamente si manifesta con anomalie a carico di diversi organi e apparati, nella maggior parte congenite (Tab. 1), associate a ritardo di crescita post-natale e a deficit cognitivo di entità variabile.
La sindrome si associa inoltre ad alterazioni della funzione immunitaria con la comparsa in età pediatrica di patologie autoimmuni - come vitiligine, tiroiditi autoimmuni, ipogammaglobulinemia e citopenie immunomediate - diagnosticate in circa il 20% dei pazienti con SK (5,6).
La più frequente fra le citopenie immunomediate è l'ITP, ma sono descritti anche rari casi di anemia emolitica autoimmune e di neutropenia immunomediata (6-8).
L'alterazione della funzione immunitaria predispone anche a un maggior rischio di complicanze infettive, spesso legate all'ipogammaglobulinemia che si riscontra in circa il 50% dei casi. Questo dato va tenuto in considerazione nel momento in cui si rende necessario un trattamento immunosoppressivo con corticosteroidi.
La somministrazione di desametasone ad alte dosi refratte si è dimostrata efficace nel trattamento dell'ITP dell'adulto (9) ed è preferibile per il minor rischio di effetti collaterali rispetto al trattamento in continuo con prednisone, soprattutto nei casi in cui alla piastrinopenia si associa la neutropenia immunomediata come nel secondo caso presentato. L'incremento del rischio infettivo caratteristico della SK è reso evidente dalla grave complicanza polmonare che si è manifestata dopo splenectomia nel primo caso presentato. Va però sottolineato come la splenectomia eseguita in età adulta non abbia comportato l'insorgenza di complicanze infettive nel follow-up, analogamente a quanto si osserva nella popolazione generale.

Considerazioni conclusive

In letteratura sono descritti diversi casi di citopenia immunomediata a insorgenza in età pediatrica. Di queste, l'ITP è quella di più frequente riscontro e il suo decorso clinico si differenzia da quello delle forme pediatriche nella popolazione generale.

LA SINDROME DI KABUKI



dr. Norio Niikawa



dr. Yoshikazu Kuroki

Le prime descrizioni della sindrome di Kabuki risalgono agli anni '60 e si devono a due medici giapponesi, il dottor Norio Niikawa e il dottor Yoshikazu Kuroki che indipendentemente descrissero i primi due casi di neonati con malformazioni congenite caratteristiche. E' del 1981 la definizione della sindrome inizialmente denominata "sindrome della maschera di Kabuki", così definita per le caratteristiche alterazioni facciali che ricordano le maschere del teatro Kabuki, una forma di teatro tradizionale giapponese risalente al XVII secolo.
In Giappone, la sua prevalenza è stimata 1 su 32.000 nati. Si tratta di una rara (poche centinaia di casi descritti al mondo) sindrome congenita correlata, nella maggior parte dei casi, a mutazioni acquisite a carico di due geni, KMT2D (histone-lysine N-methyltransferase 2D, conosciuto anche come MLL2) e KDM6A (lysine-specific demethylase 6A) (2-4), entrambi espressi in numerosi tessuti dell'organismo e coinvolti nella regolazione epigenetica del DNA (Tab. 1).
Mutazioni di KMT2D hanno una trasmissione autosomica dominante e si riscontrano nel 55-80% dei casi, mentre sono più rare le mutazioni a carico di KDM6A, 2-6%, legate al cromosoma X con pattern dominante. Gli enzimi codificati da questi due geni (una metil-tranferasi e una de-metilasi) agiscono sugli istoni regolando insieme l'espressione di diversi geni. In una minoranza di pazienti non è possibile identificare mutazioni a carico di questi geni e l'anomalia alla base della sindrome resta sconosciuta.

L'ITP pediatrica, infatti, si caratterizza per un decorso acuto, a risoluzione spontanea nella maggior parte dei casi. Al contrario, l'ITP associata a SK viene descritta come una forma cronica, recidivante e scarsamente responsiva al trattamento con corticosteroidi, proprio in ragione della disfunzione immunologica che si associa alla sindrome (5,6,10).

I due casi clinici presentati dimostrano che questa manifestazione clinica del difetto immunologico associato alla SK può presentarsi anche nel giovane adulto. Il decorso clinico e la risposta al trattamento standard dell'ITP - corticosteroidi in prima linea e splenectomia alla recidiva - sono sovrapponibili a quanto osservato nella popolazione adulta generale.

Bibliografia

1. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. Blood 2009; 113:2389-93.
2. Banka S, Lederer D, Benoit V, et al. Novel KDM6A (UTX) mutations and a clinical and molecular review of the X-linked Kabuki syndrome (KS2). Clin Genet. 2015; 87(3):252-8.
3. Bokinni Y. Kabuki syndrome revisited. J Hum Genet. 2012;57(4):223-7.
4. Bögershausen N, Wollnik B. Unmasking Kabuki syndrome. Clin Genet. 2013;83(3):201-11.
5. Ming JE, Russell KL, McDonald-McGinn DM, et al. Autoimmune disorders in Kabuki syndrome. Am J Med Genet A. 2005;132A(3):260-2.
6. Giordano P, Lassandro G,Sangerardi M, et al. Autoimmune haematological disorders in two Italian children with Kabuki Syndrome. Ital J Pediatr. 2014; 40: 10-14.
7. Watanabe T, Miyakawa M, Satoh M, et al. Kabuki make-up syndrome associated with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Acta Paediatr Jpn. 1994;36(6):727-9.
8. Stagi S, Gulino AV, Lapi E, et al. Epigenetic control of the immune system: a lesson from Kabuki syndrome. Immunol Res. 2016;64(2):345-59.
9. Mazzucconi MG, Fazi P, Bernasconi S, et al. Therapy with high-dose dexamethasone (HD-DXM) in previously untreated patients affected by idiopathic thrombocytopenic purpura: a GIMEMA experience. Blood. 2007;109(4):1401-7.
10. Torii Y, Yagasaki H, Tanaka H, et al. Successful treatment with rituximab of refractory idiopathic thrombocytopenic purpura in a patient with Kabuki syndrome. Int J Hematol. 2009;90(2):174-176.



Quando un WES può indirizzare la clinica: un paziente con sindrome di Rubinstein-Taybi



Silvia Tajè[1], Andrea Di Francesco[2], Matilde Ferrario[1], Daniela Marchetti[4], Maria Iascone[3,4], Angelo Selicorni[1]
[1] UOC Pediatria ASST Lariana, Como, [2]UOC Chirurgia Maxillo Facciale ASST Lariana, Como, [3]Laboratorio di Genetica Medica, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo; [4]FROM Fondazione per la Ricerca Ospedale Maggiore, Bergamo

Conosciamo C. all'età di 6 mesi nel corso di una visita in Ambulatorio di Genetica Clinica Pediatrica, inviato dallo specialista chirurgo maxillo-facciale che lo aveva valutato per labio-palatoschisi (LPS).

C. è unicogenito di genitori sani non consanguinei. Una precedente gravidanza è esitata in MEF; l'autopsia non aveva evidenziato malformazioni maggiori. L'anamnesi familiare è negativa per malattie genetiche o quadri malformativi. Nello specifico non sono riportati altri soggetti con labio-palatoschisi nella famiglia. La malformazione è stata evidenziata nel corso della gravidanza, durante i controlli ecografici, cariotipo ed arrayCGH non hanno evidenziato alterazioni patologiche.

Nato da taglio cesareo per presentazione podalica alla 37°+3 s.g. , segnalato polidramnios. IUGR, il peso alla nascita era 2,350 Kg (3-10° P), lunghezza 43 cm (< 3° P), CC 31 cm (<3° P), l'indice di APGAR 9/10. Nei primi giorni di vita è stato sottoposto a ventilazione ad alti flussi per comparsa di distress respiratorio a poche ore dalla nascita.

E' stata evidenziata una pervietà del dotto arterioso, con pervietà del forame ovale e arco aortico destro, con iniziale ipertensione polmonare. Fin dai primi giorni di vita, C. ha presentato iponatriemia persistente, tale da richiedere supplementazione con NaCl. Nella norma gli esami ormonali basali (ADH, aldosterone, cortisolo, ACTH, TSH), l'elettrolituria su 24 ore, il test del sudore, l'ecografia addominale. La RMN encefalo evidenziava solo una modesta riduzione della mielinizzazione senza alterazioni dello studio spettroscopico. Per difficoltà ingravescenti nella suzione con insufficiente incremento ponderale, all'età di 3 mesi è stata posizionata gastrostomia, con successiva ripresa della crescita.

Il paziente presenta microcefalia, pollici ed alluci larghi ed ipertelorismo

Al momento della nostra valutazione ambulatoriale, C. pesa 4,650 kg (<3° P), la lunghezza è di 55,5 cm (<3° P), la circonferenza cranica di 35 cm (<<3° P). Presenta una brachicefalia con plagiocefalia, ipertelorismo e fessure palpebrali lunghe, importante labio-palatoschisi bilaterale (Fig. 1).

Si evidenziano un discreto ipotono assiale ed edemi

Fig. 1 **Aspetti del viso del paziente prima della correzione chirurgica della LPS**



a carico del dorso di mani e dei piedi. L'obiettività toracica e addominale è nella norma. Al cuore: presenta impurità sistolica mentre a livello dei genitali è evidente micropene, criptorchidismo bilaterale.
Il piccolo è stato ricoverato per inquadramento diagnostico presso la nostra struttura. E' stata ripetuta RMN encefalo che ha documentato parziale agenesia del corpo calloso (ginocchio e rostro), ventricoli laterali ampliati, parziale fusione dei fornici del setto pellucido, sospetta ipoplasia del tratto ottico di sinistra, sospetta agenesia del bulbo olfattorio sinistro, adenoipofisi e peduncolo normali ma iperintensità neuroipofisaria non chiaramente riconoscibile. La visita oculistica ha confermato sospetto deficit visivo corticale, il test ABR ha evidenziato lieve ipoacusia trasmissiva a sinistra. EEG nella norma. All'Rx dei piedi riscontro di assenza della falange intermedia del V dito bilateralmente.
Sono stati ripetuti esami per lo studio dell'asse ipotalamo-ipofisario, che hanno documentato normale funzione tiroidea e surrenalica; i valori di gonadotropine dopo test di stimolo sono risultati suggestivi per possibile ipogonadismo ipogonadotropo. IGF-1 inferiori alla norma, mai episodi di ipoglicemia. Gli accertamenti eseguiti hanno escluso un ipocorticismo e una "central salt wasting syndrome" quali cause della iponatriemia mentre i dati clinici e laboratoristici sembrano, invece, orientare per un quadro SIADH-like che ha risposto alla restrizione di liquidi. Il quadro è stato ben controllato mediante integrazione con NaCl.
All'età di 8 mesi è stato effettuato il primo intervento di correzione per labiopalatoschisi. Durante l'intervento si è osservata importante ipercapnia transitoria che è stata adeguatamente corretta.
Poiché il quadro clinico, pur essendo orientativo per una patologia genetica sindromica su base costituzionale, non permetteva di porre ipotesi diagnostiche specifiche è stato scelto di eseguire l'analisi dell'intero esoma sul probando ad entrambi i genitori (trio-WES). L'analisi è stata eseguita mediante ibridazione di sonde complementari alle regioni codificanti per proteine del genoma umano (esoma) al DNA del probando e dei genitori. Dopo il sequenziamento e l'elaborazione del dato grezzo, prodotto dallo strumento, mediante strumenti bioinformatici ad hoc, la lista delle varianti ottenute è stata filtrata. Questo passaggio consente di selezionare le varianti potenzialmente significative, considerando le caratteristiche cliniche del probando e il modello di trasmissione ipotizzato per la condizione nella famiglia. In assenza di familiarità, il primo modello che si testa è quello per le condizioni sporadiche, causate solitamente da mutazioni *de novo* (assenti nei genitori) nell'esoma del probando.

Fig. 2 **Pollici ed alluci rivalutati nel sospetto di RTS generato da WES**



Il risultato dell'analisi WES mostra la presenza della variante *de novo* p.Arg483ter nel gene CREBBP, suggerendo la diagnosi di sindrome di Rubinstein-Taybi

Nei mesi successivi, C. ha presentato respiro rumoroso con necessità di frequenti aspirazioni delle prime vie respiratorie e frequenti episodi di infezioni delle alte vie, trattate con antibioticoterapia a domicilio; è stato nuovamente ricoverato per infezione delle vie urinarie da E. coli multiresistente, la cistoscintigrafia è risultata nella norma.
Il piccolo ha effettuato controlli seriati dell'equilibrio acido-base e degli elettroliti, che hanno evidenziato progressiva comparsa di alcalosi metabolica e ipocloremia con iponatriemia, e incremento di renina e aldosterone; parziale risposta alla restrizione di liquidi ma graduale ripresa della normalità dopo somministrazione di NaCl, anche per quanto riguarda renina e aldosterone.
Il risultato dell'analisi WES è giunto alla nostra attenzione quando C. aveva 16 mesi. L'indagine ha mostrato la presenza della variante *de novo* p.Arg483ter nel gene CREBBP. Tale variante porta alla produzione di una proteina tronca e ha suggerito la

Fig. 3 **Fenotipo facciale classico dei pazienti con RTS**



Fig. 4 **Pollici slargati in pazienti con RTS**



diagnosi di sindrome di Rubinstein-Taybi (RTS).
L'esito dell'indagine genomica ha comportato un'attenta rivalutazione del fenotipo del bambino, grazie a cui abbiamo valorizzato uno slargamento di pollici e alluci (Fig. 2), caratteristiche tipiche della RTS che, associate alle già note anomalie dell'accrescimento, dello sviluppo psicomotorio, alle anomalie genitali, labio-palatine e cardiache, supportavano il sospetto di RTS.
Una volta avvenuta la correzione chirurgica della malformazione facciale le stesse caratteristiche del volto del bambino, grazie anche all'evoluzione nei mesi della sua fisionomia sono risultate più convincenti per la diagnosi suggerita dall'indagine genomica di RTS.

La sindrome di Rubinstein-Taybi (RTS)

Ha un'incidenza di 1:100.000 – 125.000 nati vivi, è una sindrome genetica caratterizzata da tratti somatici peculiari, alluci e/o pollici slargati e angolati, bassa statura e ritardo di sviluppo di grado moderato o severo.

La sindrome di Rubinstein-Taybi è caratterizzata da tratti somatici peculiari, alluci e/o pollici slargati, bassa statura e ritardo di sviluppo di grado moderato o severo

Le anomalie minori che costituiscono la gestalt facciale comprendono fessure palpebrali orientate verso il basso dall' esterno all'interno, radice nasale alta con columella prominente al di sotto delle ali del naso, palato ogivale, cuspidi appuntite sul lato interno degli incisivi permanenti. L'espressione del viso delle persone con RTS è assai specifica; è soprattutto caratteristico il sorriso con chiusura quasi completa delle rime palpebrali. (Fig. 3)
A livello delle estremità oltre alla tipica forma slargata o bifida degli alluci e dei pollici (in un terzo dei casi associata a deviazione radiale (Fig. 4), anche le falangi terminali delle altre dita possono essere slargate.
Si possono associare inoltre anomalie maggiori a carico di vari organi ed apparati:

- **Anomalie cardiache** (24-48%): nella maggioranza come difetto unico (pervietà del dotto arterioso, difetti settali, coartazione o stenosi della polmonare).
- **Anomalie del Sistema Nervoso Centrale** (5-25%): mielopatia per stenosi della giunzione cranio-vertebrale da alterazioni delle vertebre cervicali, malformazioni di Chiari, siringomielia, midollo ancorato. Nel 74% dei casi: alterazioni del corpo calloso.
- **Anomalie dell'apparato genitourinario e renale** (50-75%): criptorchidismo, ipospadia, alterazioni renali causa di frequenti infezioni delle vie urinarie.

In termini auxologici la crescita prenatale generalmente è nella norma, nel periodo post-natale l'altezza e la circonferenza cranica sono solitamente al di sotto dei limiti di norma tanto che la presenza di sovrappeso/franca obesità è una delle complicanze più frequenti di questa condizione e tende a manifestarsi durante l'infanzia nei maschi e durante l'adolescenza nelle femmine.
Lo sviluppo puberale e sessuale è normale. A livello ormonale sono descritti singoli pazienti con deficit di

Tab. 1 Valutazioni clinico strumentali suggerite nel follow-up dei pazienti con RTS

Accertamenti clinici/strumentali	Cadenza
Visita pediatrica e auxologica	Alla diagnosi, nei primi 3 anni ogni 6 mesi, poi annuale
Visita NPI	Alla diagnosi, poi in base all'evoluzione
RMN encefalo, EEG e Rx colonna	Secondo necessità clinica
Visita cardiologica, ecocardiogramma, ECG	Alla diagnosi, successivamente in base alle eventuali problematiche riscontrate
Ecografia addominale (per valutazione delle vie urinarie)	Alla diagnosi, poi in base alle problematiche riscontrate
Visita oculistica	Alla diagnosi, poi annuale o in base alle problematiche riscontrate
Elettroretinogramma	Ogni 5 anni dopo i 16 anni di età
Esame audiologico	Alla diagnosi, poi annuale o più frequentemente secondo necessità clinica
Visita odontoiatrica	Al primo anno di età, poi semestrale
Visita ortopedica, fisiatrica con eventuale Rx (pollici, alluci, articolazioni e colonna)	Alla diagnosi, poi annuale o in base alle problematiche riscontrate
Visita gastroenterologica (RGE, stipsi)	Su indicazione clinica
Visita urologica (criptorchidismo)	Su indicazione clinica
Visita ORL (OSAS)	Su indicazione clinica
Valutazione dermatologica	Su indicazione clinica
Valutazione dietologica	Su indicazione clinica
Polisonnografia	Su indicazione clinica

I pazienti possono presentare inoltre anomalie a livello cardiaco, del sistema nervoso centrale, dell'apparato genitourinario e renale, a livello oculare, cutaneo e odontoiatrico

GH, ipotiroidismo congenito, ipoplasia ipofisaria.

Lo sviluppo psicomotorio è caratterizzato da un ritardo globale che generalmente varia da una gravità moderata a severa; è comunque presente una discreta variabilità individuale. Nei giovani-adulti insorgono frequentemente disturbi dell'umore, ansia e alterazioni comportamentali.

In termini di **complicanze mediche** non raro è il riscontro di **problematiche ortopediche** quali dislocazione della rotula, iperlassità legamentosa, anomalie di curvatura della colonna, petto escavato, morbo di Perthes. È presente epilessia nel 25-27% dei casi, ma le anomalie all'EEG sono riscontrabili in un terzo dei casi. Dal punto di vista **ORL** sono discretamente frequenti le apnee ostruttive del sonno e le problematiche a carico dell'orecchio medio (50%), con ipoacusia transmissiva che spesso peggiora una già coesistente ipoacusia neurosensoriale (25%). A **livello oculare** possono essere presenti strabismo (33-58%), difetti di rifrazione (41%), ptosi palpebrale, ostruzione dei dotti lacrimali, cataratta, coloboma, nistagmo, glaucoma e anomalie corneali. Con l'aumentare dell'età insorgono disfunzioni retiniche nel 78% dei pazienti, dimostrabili con elettroretinogramma. A **livello cutaneo** possibile formazione di cheloidi in seguito a traumi cutanei anche minimi. Occasionale ma non raro l'insorgenza di pilomatrixomi. I pazienti con RTS mostrano anche svariate possibili **anomalie odontoiatriche** quali sovraffollamento dentale, malocclusione, carie multiple, ipodontia, iperdontia, denti neonatali e le cuspidi caratteristiche a livello degli incisivi superiori. In letteratura sono riportati pazienti con sindrome di Rubinstein Taybi e **labio-palatoschisi** in associazione ad alterazione del gene CREBBP.

Molto frequentemente (80%) i lattanti con RTS manifestano difficoltà nella suzione e deglutizione, a volte con necessità di alimentazione enterale (trami-

Tab. 2 **Diagnosi differenziale della sindrome di Rubinstein-Taybi**

Condizione	Caratteristiche	Difetto di base
Sindrome di Floating-Harbor	conformazione craniofacciale tipica, basso peso alla nascita con circonferenza cranica normale e bassa statura, ritardo di maturazione ossea che si normalizza in età scolare, anomalie scheletriche (brachidattilia, clubbing, clinodattilia, pollici corti, anomalie delle clavicole, articolazioni prominenti); sono presenti inoltre un severo ritardo di linguaggio, voce nasale, ritardo intellettivo lieve-moderato	Mutazione autosomica dominante del gene SRCAP
Sindrome di Cornelia de Lange	Note dismorfiche specifiche, ritardo di crescita e sviluppo, irsutismo, difetti in riduzione degli arti superiori	Mutazioni di geni delle coesine (NIPBL; SMC1A, RAD21, HDAC8, SMC3, BRD4). Da considerare per la segnalazione di un paziente con fenotipo CdLS e mutazione del gene EP300 con WES
Brachidattilia di tipo D	Pollici slargati come riscontro isolato	Mutazione autosomica dominante del gene HOXD3
Acrocefalo-polisindattilie (S di Sathre-Chotzen, S Pfeiffer)	Associazione tra anomalie variabili di mani e piedi con coinvolgimento di pollici ed alluci e quadri di craniostenosi	S Saethre Chotzen mutazione autosomica dominante (o delezione) del gene TWST1, S di Pfeiffer mutazione gene autosomica dominante dei geni FGFR1-2
Cefalopolisindattilia di Greig	Polidattilia preassiale o mista pre-post assiale, ipertelorismo, macrocefalia. Possibile presenza di epilessia e disabilità intellettiva	Mutazione autosomica dominante del gene GLI3

L'analisi WES deve essere considerata esame diagnostico fondamentale in tutte le situazioni in cui il quadro clinico è orientativo per una condizione genetico-costituzionale ed in cui non è possibile porre ipotesi diagnostiche gestaltiche

te sondino naso gastrico o PEG). Talora si associa reflusso gastro-esofageo (25-50%), spesso con sintomatologia atipica come agitazione notturna, sialorrea, tosse stizzosa o infezioni respiratorie ricorrenti. E' stata infine dimostrata una correlazione fra RTS e incrementata incidenza di **neoplasie** benigne e maligne di varia origine (più frequentemente derivanti dalla cresta neurale), quali meningiomi e altri tumori encefalici, pilomatrixomi, rabdomiosarcomi narofaringei, neurilemmomi intraspinali, feocromocitomi, seminomi, leucemie e carcinomi mammari. Spesso tali tumori si manifestano nell'età dell'infanzia, prima dei 15 anni; più frequenti nell'età adulta i meningiomi. La predisposizione tumorale viene ricondotta al ruolo di CREBBP e EP300 (geni malattia della condizione) in alcuni pathways di soppressione tumorale. A differenza di altre sindromi "cancer predisposing", nella RTS non è definito un protocollo di follow-up a causa della variabilità di sede dei tumori descritti. La tabella 1 mostra i principali accertamenti strumentali e clinici previsti nel follow-up della sindrome di Rubinstein-Taybi, la tabella 2 raccoglie le condizioni cliniche da considerare in diagnosi differenziale.

Eziologia

La sindrome di Rubinstein-Taybi è caratterizzata, come la gran parte delle sindromi genetiche più comuni, da una eterogeneità genetica. La condizione risulta infatti causata da microdelezioni a carico del braccio corto del cromosoma 16 (16p13.3) coinvolgenti il gene CREBBP (5-10%), mutazioni pun-

tiformi di questo stesso gene (50-60%) e mutazioni del gene EP300 (5-8% circa). Nei soggetti con alterazioni del gene EP300, le caratteristiche peculiari del volto e delle estremità sono meno marcate e rendono più difficile il riconoscimento gestaltico; si associa solitamente un minore ritardo di sviluppo.
L'utilizzo dei test citogenetico-molecolari combinati consente quindi di identificare il difetto di base in circa l'80% dei casi. Nella restante parte dei casi, soprattutto in caso di fenotipi lievi, bisogna tener presente l'eventualità di un mosaicismo somatico, che può essere dimostrato ripetendo le indagini molecolari su tessuti diversi dai linfociti del sangue periferico (analisi della saliva, del brushing buccale o dei fibroblasti cutanei).
Il difetto genetico della condizione si trasmette con una modalità autosomica dominante; ciò significa che un soggetto affetto presenta un rischio del 50% di trasmettere il difetto genetico alla progenie indipendentemente dal sesso del nascituro. Nella maggioranza di casi la mutazione causativa insorge generalmente in modo casuale (*de novo*) nella linea germinale materna o paterna.
Da segnalare l'Associazione Italiana di genitori di soggetti con RTS: Associazione Italiana sindrome di Rubinstein-Taybi - Tel. 393/5817528 - www.rubinstein-taybi.it - e-mail: info@rubinstein-taybi.it.

Conclusioni

Nel paziente descritto l'analisi WES ha permesso di raggiungere la diagnosi di sindrome di Rubinstein Taybi in tempi rapidi in un soggetto in cui l'espressione del quadro dismorfologico era inizialmente fortemente condizionata dalla gravissima labio-palatoschisi e l'andamento clinico pediatrico caratterizzato dalle anomalie degli elettroliti a tutt'oggi di difficile inquadramento in ambito fisio-patologico.
Come ormai ampiamente segnalato da più parti nella letteratura internazionale, l'analisi WES deve essere fortemente considerata come esame diagnostico fondamentale in tutte quelle situazioni in cui il quadro clinico è fortemente orientativo per una condizione genetico costituzionale ed in cui non è possibile porre ipotesi diagnostiche gestaltiche.
Questo approccio permette infatti con una notevole efficienza (variabile da casistica a casistica tra il 30 ed il 50%) sia di identificare condizioni ultra rare la cui diagnosi e la cui conferma molecolare sono spesso fuori dalla portata di un percorso clinico tradizionale, sia di individuare condizioni note in pazienti in cui, come nel caso descritto, il fenotipo clinico mostra una espressione particolarmente atipica che mina il suo facile riconoscimento gestaltico.

Bibliografia

1. Ajmone PF, Avignone S, Milani D, et al. Rubinstein–Taybi syndrome: New neuroradiological and neuropsychiatric insights from a multidisciplinary approach. Am J Med Genet. 2018;1–10.
2. Bartsch O, Kress W, Kempf O, et al. Inheritance and variable expression in Rubinstein-Taybi syndrome. Am J Med Genet. PartA 2010;152A:2254-61.
3. Bentivegna A, Milani D, Gervasini C, et al. Rubinstein-Taybi Syndrome: spectrum of CREBBP mutations in Italian patients. BMC Med Genet. 2006;7:77.
4. Boot MV, van Belzen MJ, de Jong D, et al. Benign and malignant tumors in Rubinstein–Taybi syndrome. Am J Med Genet. 2018;1–12.
5. Demeer B, Andrieux J, Mathieu-Dramard M, et al. Duplication 16p13.3 and the CREBBP gene: confirmation of the phenotype. Eur J Med Genet 2013 Jan;56(1):26-31.
6. Dallapiccola B, Bernardini L, Mingarelli R, et al. Expanding the phenotype of duplication of the Rubinstein–Taybi region on 16p13.3. Am J Med Genet A 2009;149A:2867–2870.
7. Fergelot P, Van Belzen M, Hennekam RC, et al. Phenotype and genotype in 52 patients with Rubinstein–Taybi syndrome caused by EP300 mutations. Am J Med Genet 2016;170:3069-3082.
8. Hennekam RC, Rubinstein–Taybi syndrome. Eur J Hum Genet. 2006;14, 981–985.
9. Hennekam RC, Van Doorne JM. Oral aspects of Rubinstein-Taybi syndrome. Am J Med Genet Suppl. 1990;6:42-47
10. Levenson D. Whole-exome sequencing strategy proposed as first-line test: WES for well-phenotyped infants leads to high diagnostic yield Am J Med Genet A. 2016 Jun;170:1387-8
11. Selicorni A, Zampino G, Memo L, et al. Le sindromi malformative: una guida per il pediatra. Pacini Editore Srl, 2017
12. Tuysuz B, van Bon BW, de Vries BB, et al. A microduplication of the Rubinstein-Taybi region on 16p13.3 in a girl with a bilateral complete cleft lip and palate and severe mental retardation. Clin Dysmorphol 2012 Oct;21:204-7.
13. Valencia CA, Husami A, Holle J, et al.Clinical Impact and Cost-Effectiveness of Whole Exome Sequencing as a Diagnostic Tool: A Pediatric Center's Experience Front Pediatr. 2015;3;3:67.
14. Wiley S, Swayne S, Rubinstein JH, et al. Rubinstein-Taybi syndrome medical guidelines. Am J Med Genet A. 2003;119A:101-10.
15. Woods S, Robinson HB, Khalifa M, et al. Exome sequencing identifies a novel EP300 frame shift mutation in a patient with features that overlap Cornelia de Lange syndrome. Am J Med Genet A 2014;164A:251–258.



Malattie da accumulo lisosomiale: nuove prospettive terapeutiche grazie a CRISPR/Cas9



Maria Rachele Ceccarini
Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Perugia

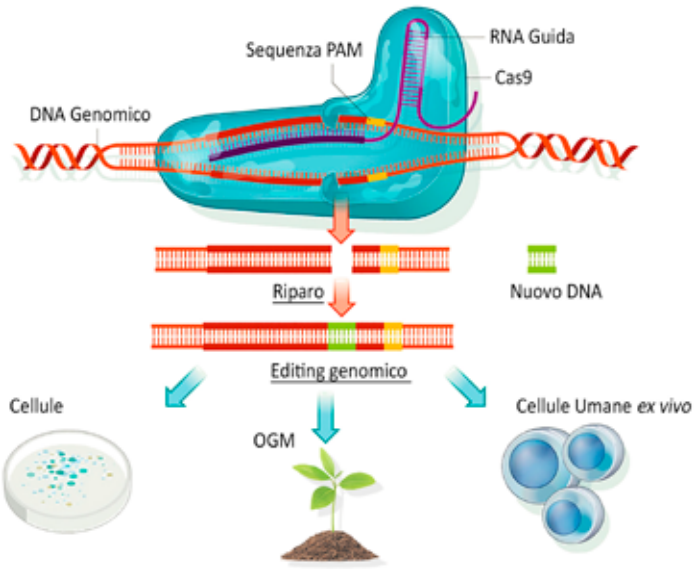
Cercare di codificare prima e modificare poi il genoma di un essere vivente non è solo un sogno portato avanti da scrittori e registi di film di fantascienza, ma è uno sforzo quotidiano che molti genetisti cercano di perseguire con strumenti e tecnologie sempre più innovative e potenti per poter correggere errori genetici che sono alla base di molte malattie.

A partire dal 1953, anno in cui fu annunciata la scoperta della struttura del DNA da parte di J. Watson, F. Crick e M. Wilkins (Premio Nobel 1962) i ricercatori di tutto il mondo hanno cercato di comprendere i meccanismi che regolano la trascrizione genetica, al fine di manipolare la doppia elica di acido desossiribonucleico (DNA) presente all'interno di tutte le cellule viventi dove guida il flusso di informazione che sta alla base di ciascun processo fisiologico. L'ultima tappa del lungo percorso verso questo ambizioso traguardo si chiama CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, ovvero Brevi Ripetizioni Palindrome Raggruppate e Separate a Intervalli Regolari). Gli scienziati hanno scoperto questo fine meccanismo nei batteri che lo utilizzano come sistema di difesa, una sorta di sistema immunitario che permettere di preservare l'integrità del genoma batterico da eventuali intromissioni esterne; in pratica CRISPR/Cas9 è un meccanismo in grado di riconoscere, tagliare ed eliminare le sequenze di DNA estraneo.

La tecnologia CRISPR/Cas9 è un sistema pionieristico e versatile che permette, ad un prezzo accessibile, di "editare" il DNA, ovvero di tagliare e incollare porzioni di genoma, sostituendo ad esempio un gene difettoso con la sua variante corretta. Dal 2012 modificare il materiale genetico di qualsiasi essere vivente, dal grano alle giraffe, dalla Drosophila all'uomo è possibile grazie a questa straordinaria ed elegante tecnologia. CRISPR/Cas9 agisce come una "forbice molecolare" che necessita fondamentalmente di due attori principali: un RNA guida, complementare alla sequenza di DNA bersaglio, ovvero un RNA che contenga un "indirizzo specifico" (comprensivo di numero civico) così da essere spedito verso la regione di DNA che si vuole modificare, e una proteina, per l'esattezza una endonucleasi Cas (Crispr associated system) che, una volta legata all'RNA guida, arriva a destinazione e opera il taglio del doppio filamento

La tecnologia CRISP/Cas9 permette di tagliare ed incollare porzioni di genoma sostituendo un gene difettoso con la sua variante corretta

Fig. 1 **Tecnologia CRISPR/Cas9 e suoi impieghi**



CRISP/Cas9 trova applicazione nelle malattie genetiche rare, per cui ancora oggi non esistono terapie efficaci

di DNA come una vera e propria forbice. La porzione di DNA può essere poi ricucita sfruttando il meccanismo di ricombinazione omologa con un frammento di DNA sintetizzato in laboratorio così da correggere l'errore genetico responsabile della patologia (Fig. 1).
La tecnica dell'editing genomico ha già trovato applicazioni in campo agroalimentare, dove ha iniziato a rivoluzionare il dibattito sugli OGM, ma sta avendo altrettanto successo in ambito terapeutico soprattutto per malattie genetiche rare, per le quali ancora oggi non esistono terapie efficaci.

Stato dell'arte

L'elegante tecnologia CRISPR/Cas9, considerata dal mondo scientifico come "l'ultima frontiera dell'ingegneria genetica", è stata attualmente approvata in vitro su cellule staminali pluripotenti umane per correggere specifiche mutazioni genetiche. I primi risultati incoraggianti per la cura della distrofia muscolare di Duchenne (DMD) sono stati pubblicati su riviste scientifiche internazionali e hanno dimostrato l'applicabilità della strategia terapeutica basata su CRISPR/Cas9 su modelli sperimentali murini per la DMD (1). Ulteriori goal sono stati ottenuti su cellule in vitro per curare diverse patologie: prime fra tutte la fibrosi cistica (2) e la β-talassemia (3), ma anche per correggere errori genetici su modelli di cellule tumorali. Nuovi orizzonti, inoltre, si aprono per la cura di malattie virali, quali, ad esempio, l'HIV.
Senza dubbio molte malattie da accumulo lisosomiale (LSD) potrebbero essere candidate per questo tipo di approccio innovativo di *gene editing* per tre ragioni principali: a) sono causate da mutazioni in un singolo gene; b) l'enzima lisosomiale sintetizzato può raggiungere facilmente l'organo/tessuto bersaglio; c) attualmente le terapie in uso sono limitate, o meglio, non riescono a ristabilire a pieno i livelli normali di enzima e quindi le condizioni fisiologiche.
Ad oggi le terapie presenti sul mercato per diverse LSD, malattie metaboliche ereditarie causate, quindi, da un deficit di una delle diverse funzioni lisosomiali, sono molteplici e comprendono approcci terapeutici diversi (Tab. 1) che vanno dalla terapia enzimatico sostitutiva (ERT) alla terapia farmacologica con molecole chaperone (PTC), dal trapianto di cellule ematopoietiche proveniente da un donatore sano (HSCT) alla terapia di riduzione del substrato (SRT). Tutti i trattamenti utilizzati, seppur innovativi, non riescono a curare definitivamente la malattia genetica, non sono disponibili per tutte le LSD, presentano diverse limitazioni relative alla tossicità e alla risposta immunologica del paziente dopo trattamento prolungato e, soprattutto, una delle maggiori criticità è la biodisponibilità degli agenti terapeutici che spesso non riescono a raggiungere l'organo/tessuto d'interesse (ad es. superare la barriera emato-encefalica e arrivare al cervello).

Tab. 1 **Trattamenti ad oggi disponibili per le diverse LSD e potenziali (+) utilizzi della tecnologia CRISPR/Cas9 per correggere le mutazioni responsabili per la patologia**

LSD	Gene mutato	Terapie in uso	Esempi di farmaci in commercio	CRISP/Cas9
Sanfilippo A (MPS IIIA)	SGSH	SRT	Genisteina	+
Sanfilippo B (MPS IIIB)	NAGLU	SRT	Genisteina	+
Pompe	GAA	ERT	Aguclosidasi alfa	+
Niemann-Pick A	SMPD1	-	-	+
Gaucher (GD)	GBA1	ERT; SRT; PCT	Aglucerasi e eliglustat; ambroxolo	+

I trattamenti attuali per le malattie lisosomiali presentano limitazioni quali tossicità, problemi di risposta immunologica e di biodisponibilità degli agenti terapeutici che spesso non raggiungono l'organo/tessuto di interesse

Strategie terapeutiche (cliniche)

Con la tecnologia CRISPR/Cas9 le potenzialità della terapia genica aumentano enormemente e con essa aumentano anche la biosicurezza e la precisione.

Una delle prime LSD presa in esame come punto di partenza per lo sviluppo di una terapia genica mirata è stata la **sindrome di Sanfilippo** (4), nota nel mondo scientifico come mucopolisaccaridosi III (MPS III), una rara LSD caratterizzata dall'accumulo di eparansolfato nei lisosomi. La patologia è monogenica e causa un profondo ritardo cognitivo, perdita delle capacità motorie e, nelle forme più gravi, porta alla morte precoce del paziente. L'unico intervento farmacologico possibile oggigiorno e impiegato su tutti i pazienti malati è la terapia di riduzione del substrato (SRT) che riesce in parte a minimizzare gli effetti collaterali della disfunzione metabolica (Tab. 1). Nel 2014 nel Centro Ospedaliero Universitario Bucêtre di Parigi sono stati sviluppati i primi trial clinici (fase I e II) che prevedevano l'utilizzo di vettori virali adeno-associati che trasportavano le varianti umane corrette dei geni SGSH e SUMF1, in associazione con una terapia immunosoppressiva, nei bambini affetti da MPS di tipo IIIA (5). I risultati sono stati così incoraggianti, che gli stessi ricercatori hanno deciso di estendere lo studio e concentrarsi anche sulla MPS di tipo IIIB. In questo caso sono stati presi in esame 4 pazienti (53 mesi, 20, 26 e 30 anni) affetti da MPS IIIB ai quali è stata somministrata una singola terapia con adenovirus-associato ed è stato visto essere in grado di ristabilire l'attività della proteina NAGLU portandola dallo 0% basale fino al 14-17% dopo tre mesi, effetto che si è dimostrato persistere anche a distanza di 1 anno, ma non più presente a distanza di 30 mesi su 3 pazienti dei 4 totali. Per aumentare l'efficacia di tale terapia genica è senz'altro importante intervenire nei primi mesi/anni di vita del paziente (non a caso i migliori risultati sono stati evidenziati sul paziente di 53 mesi); inoltre è già stata ipotizzata un'azione mirata su cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) con la tecnologia CRISPR/Cas9 per intervenire sulla variante mutata del gene NAGLU (6).

L'approccio CRISPR/Cas9 potrebbe essere applicato anche ad un'altra LSD: la **malattia di Pompe** (7). Questa patologia è caratterizzata dal mancato smaltimento del glicogeno in glucosio da parte dell'enzima lisosomiale α-glucosidasi acida (GAA). Per questo motivo il glicogeno si accumula non solo nelle fibre muscolari (dove il danno è più marcato), ma danneggia anche altri organi e tessuti come il cuore e l'apparato respiratorio. Seppur presente una terapia enzimatico sostitutiva (Tabella 1), a partire dal 2010 molti sono stati i tentativi di *gene editing* messi in atto. La stragrande maggioranza impiegava esclusivamente vettori lentivirali (8), ma nel 2017 in California al Children's Hospital of Orange County (USA) il gruppo di ricerca guidato da Jeffrey Y. Huang e Raymond Y. Wang ha messo a punto una tecnica basata su CRISPR/

Cas9 per generare modelli di Pompe infantili ad insorgenza tardiva, gettando così le basi per una futura terapia genica.
Altra LSD ideale dove poter intervenire con la metodica CRISPR/Cas9 è senza dubbio la **malattia Niemann-Pick A** dato che per questa rara malattia metabolica ad oggi non esistono cure efficaci (Tab. 1). La Niemann-Pick A (forma classica infantile) è causata da un deficit di sfingomielina fosfodiesterasi (SMPD1) e ha un esordio precoce, si manifesta infatti nei primi mesi di vita (6-12 mesi) con epatosplenomegalia progressiva e deterioramento (9).
La **malattia di Gaucher**, infine, è senza dubbio la più frequente tra le LSD e ha dimostrato avere una forte associazione con il morbo di Parkinson (PD) e con altre sinucleinopatie, malattie neurodegenerative caratterizzate dallo sviluppo di aggregati intracellulari di alfa-sinucleina, come ad esempio la Demenza con corpi di Lewy. Si tratta di una patologia da accumulo lisosomiale autosomica recessiva causata da un deficit nell'enzima glucocerebrosidasi a seguito di mutazioni a carico del gene GBA1 (beta-glucosidasi acida, 1q21). La mancanza dell'enzima comporta l'accumulo di glucosilceramidi (o glucocerebrosidi) nelle cellule reticolo-endoteliali del fegato, della milza e del midollo osseo. Ad oggi sono disponibili trattamenti convenzionali basati su terapia enzimatica sostitutiva (ERT), ma si tratta di un approccio costoso, che richiede una somministrazione continuativa e soprattutto risulta essere poco efficace per le forme neurologiche gravi. Proprio per questo motivo c'è un estremo bisogno di nuove opzioni terapeutiche per i pazienti affetti dalle forme più gravi e debilitanti della malattia di Gaucher.

Sfide future

L'utilizzo della tecnologia CRISPR/Cas9 per ristabilire la corretta sequenza nucleotidica del gene

Sindrome di Sanfilippo, malattia di Pompe, malattia di Niemann-Pick A e malattia di Gaucher sono le LSD per cui la metodica CRISP/Cas9 mostra potenzialità promettenti

Per arrivare alla sperimentazione *in vivo* andranno superate le problematiche di sicurezza e di efficienza con cui si raggiungono i tessuti e gli organi bersaglio

GBA1 è un lavoro particolarmente arduo e complesso a causa dello pseudogene GBAP1, con il quale condivide circa il 96% della sequenza (10). Inoltre il gene GBAP1 se letto nella direzione opposta costituisce parte della sequenza della proteina di membrana mitocondriale MTX1, quindi l'alta probabilità di modificare non il gene bersaglio GBA1, ma il suo pseudo gene è un problema da risolvere.
Nel 2017 i ricercatori dell'ICGEB di Trieste hanno sviluppato una tecnologia basata sull'utilizzo di cellule staminali ematopoietiche autologhe (HSCs), le quali sono ingegnerizzate per l'espressione della forma terapeutica *wild-type* del gene GBA e poi reinfuse nel paziente.
La strategia è resa possibile proprio grazie all'innovativa piattaforma CRISPR/Cas9 e all'utilizzo di vettori lentivirali contenenti la sequenza genetica terapeutica, i quali non si integrano nel genoma del paziente, limitando i problemi legati all'integrazione casuale del vettore e il possibile sviluppo di tumori. Le cellule ematopoietiche modificate possono poi essere utilizzate per un trapianto autologo, evitando in questo modo problemi correlati all'immunocompatibilità. Questo approccio può essere applicato con successo per tutte le 300 mutazioni note a carico del gene GBA. Se questo approccio dovesse dare dei buoni risultati apporterà significativi miglioramenti clinici per i pazienti affetti da Gaucher e potrà essere applicato non solo a tutte le mutazioni identificate a carico del gene GBA1, ma anche ad altre LSD (11).
In conclusione, CRISPR/Cas9 è senza dubbio una tecnica di *gene editing* innovativa e a basso costo che sembra avere potenzialità promettenti per la cura di numerose malattie genetiche per le quali ad oggi non sono ancora disponibili terapie efficaci. Questa tecnica si è dimostrata vincente nel correggere *in vitro* mutazioni chiavi associate a numerose malattie, come ad esempio la fibrosi cistica e la β-talassemia. Infatti al contrario dei nor-

mali vettori virali utilizzati per terapia genica questa tecnica pioneristica offre numerosi vantaggi: consegna mirata, nessuna mutagenesi inserzionale e bassa immunogenicità (12).
Un aspetto critico sarà senz'altro quello di agire in modo sicuro ed efficiente in termini di quantità di cellule da modificare e in termini di sicurezza per la salute dei pazienti.
Ad oggi la sperimentazione sull'uomo si realizza *ex vivo*, cioè sulle cellule prelevate da un individuo per essere corrette e reinfuse, come le cellule staminali ematopoietiche, linfociti o cellule staminali pluripotenti indotte (13). L'altro campo d'azione, ancora inesplorato, è quello *in vivo* e prevede l'utilizzo di CRISPR/Cas9 direttamente nell'organo bersaglio. In questo caso esistono per ora solo modelli sperimentali (per la maggior parte murini) e, senza dubbio, prima di arrivare alla sperimentazione sull'uomo, sarà necessario superare problematiche relative alla sicurezza di queste strategie e all'efficienza con cui si raggiungono i tessuti e gli organi bersaglio. Prima di tradurre in clinica questa tecnologia sono ancora molte le sfide da dover superare, ma le opportunità e gli orizzonti aperti sembrano essere davvero promettenti ed interessanti.

Bibliografia

1. Long C, McAnally JR, Shelton JM, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. Science. 2014; 345 (6201): 1184-1188.
2. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell Stem Cell. 2013; 13 (6): 653-8.
3. Xie F, Ye L, Chang JC, et al. Seamless gene correction of β-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. Genome Res. 2014; 24 (9): 1526-33.
4. Fedele AO. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. Appl Clin Genet. 2015; 8: 269-81.
5. Tardieu M, Zérah M, Husson B, et al. Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human-SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. Hum Gene Ther. 2014; 25 (6): 506-16.
6. Tardieu M, Zérah M, Gougeon ML, et al. Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial. Lancet Neurol. 2017; 16 (9): 712-720.
7. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. Lancet. 2008; 372 (9646): 1342-53. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61555-X.
8. Liang Q, Stok M, van Helsdingen Y, et al. Lentiviral Stem Cell Gene Therapy for Pompe Disease. J Neuromuscul Dis. 2015; 2(s1): S64.
9. Schuchman EH, Desnick RJ. Types A and B Niemann-Pick disease. Mol Genet Metab. 2017; 120(1-2): 27-33.
10. Martínez-Arias R, Comas D, Mateu E, et al. Glucocerebrosidase pseudogene variation and Gaucher disease: Recognizing pseudogene tracts in GBA alleles. Hum Mutat. 2001; 17(3): 191-8.
11. Carlos R. Ferreira and William A. Gahlc. Lysosomal storage diseases. Transl Sci Rare Dis. 2017; 2(1-2): 1–71.
12. Mout R, Ray M, Lee YW, et al. In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. Bioconjug Chem. 2017; 28(4): 880-884.
13. Christensen CL, Choy FYM. A Prospective Treatment Option for Lysosomal Storage Diseases: CRISPR/Cas9 Gene Editing Technology for Mutation Correction in Induced Pluripotent Stem Cells. Diseases. 2017; 5 (1).



E. Daina, R. Parini

Dieta vegana e carenze nutrizionali

Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: a systematic review with meta-analysis of observational studies.

Dinu M, Abbate R, Gensini GF, Casini A & Sofi F. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57:17, 3640-3649, doi: 10.1080/10408398.2016.1138447

Questo studio è una meta-analisi di tutti gli studi finora pubblicati cross-sectional e di coorte prospettici sull'associazione tra vegetarianesimo e veganesimo e gli indicatori di salute come i fattori di rischio per malattie croniche, il rischio di morte per qualunque causa, incidenza e mortalità per malattie cardio-cerebrovascolari, cancro in generale e tipi specifici di cancro.

Da un esame sistematico di tutta la letteratura sull'argomento gli autori hanno selezionato più di 100 articoli eleggibili per la meta-analisi, la maggior parte cross-sectional e riguardanti la dieta vegetariana mentre la minoranza riguardava la dieta vegana. I risultati di questa meta-analisi dimostrano che le diete vegetariana e vegana sono significativamente associate a ridotti BMI (body mass index), glucosio, colesterolo totale, colesterolo LDL rispetto agli onnivori; solo la dieta vegetariana ma non la vegana è significativamente associata a ridotti livelli di colesterolo HDL e dei trigliceridi rispetto agli onnivori. L'analisi degli studi prospettici mostra una riduzione significativa di mortalità per malattia cardiaca ischemica (-25%) e per incidenza di cancro in generale (-8%) rispetto agli onnivori. La dieta vegana analizzata separatamente conferiva una ancora maggiore riduzione del rischio di incidenza di cancro in generale (-15%). Non si ha invece una riduzione di malattie cardiovascolari e cerebrovascolari nel loro complesso né della mortalità per qualunque causa o di mortalità per cancro in generale. Non è neppure dimostrata una associazione significativa con particolari tipi di cancro.

Commento

Questo studio è la prima valutazione sistematica degli effetti sulla salute in generale e sulla possibile riduzione del rischio di mortalità e di cancro che include sia studi cross-sectional che prospettici e anche la dieta vegana oltre a quella vegetariana. Risponde alla domanda se queste diete conferiscono davvero una protezione contro malattie cardiovascolari e cancro come è stato proposto negli anni scorsi sulla base di dati non sempre associati ad una stretta evidenza scientifica. Come segnalano anche gli autori, questi risultati devono essere presi con una certa cautela, considerato ad esempio l'alto livello di eterogeneità tra gli studi, il bias dato dal fatto che in generale la popolazione vegetariana e vegana è più attenta alla propria salute e assume stili di vita sobri evitando eccessi, la mancanza di informazione negli studi analizzati sul tempo intercorso tra l'inizio della dieta vegana/vegetariana e lo studio pubblicato. In conclusione questa meta-analisi conferma l'ipotesi che le diete vegetariana e vegana siano protettive nei confronti della malattia cardiaca ischemica e del cancro in generale, ma non conferma la protezione per il rischio cardiocerebrovascolare in generale né per la riduzione del rischio di morte in generale.

Is vegetarianism healthy for children?

Cofnas N. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018 Feb 23:1-9. doi: 10.1080/10408398.2018.1437024

Nathan Cofnas in questa recente review critica le posizioni dell'Academy of Nutrition and Dietetics (AND) e del Dipartimento dell'agricoltura americano (United States Department of Agriculture (USDA) che parlano di vegetarianismo e veganesimo come di sane alternative dietetiche alla dieta onnivora. In particolare l'AND sostiene che una dieta ben pianificata sia appropriata per tutti gli stadi del ciclo di vita compresi gravidanza, allattamento, infanzia, adolescenza.
Cofnas, invece, afferma che non si ha evidenza di questo e porta a sostegno vari studi che possono far sorgere dubbi fondati sulla sicurezza di una dieta senza carne nei bambini. Segnala un lavoro fatto a Bristol dove si dimostrava che il rapporto alla nascita maschi/femmine era di 81.5/100 nelle donne vegetariane contro il normale rapporto 106/100 nelle onnivore. Come è noto questo rapporto si riduce sempre in situazioni di stress e di malnutrizione materna.
Contro l'affermazione che latte, uova e soia possano essere fonti proteiche completamente sostitutive della carne, riporta i risultati ottenuti da uno studio su bambini kenioti nei quali si confrontava l'effetto di una merenda mattutina a base di carne (gruppo Meat) o latte (gruppo Milk). Dopo circa due anni il gruppo Meat dimostrava un netto aumento di quoziente intellettivo per quanto riguarda il ragionamento fluido, aveva più iniziativa e attitudine alla leadership e faceva più attività fisica spontanea mentre il gruppo Milk aveva risultati peggiori dei controlli. Ciò veniva attribuito ad una maggiore carenza di zinco e ferro il cui assorbimento era inibito dalla presenza di caseina e calcio. Cofnas riporta segnalazioni che associano l'acne alla elevata assunzione di latte e latticini, la maggiore probabilità (3,5 volte) per le madri vegetariane di avere figli maschi con ipospadia, la minore biodisponibilità di zinco e ferro il cui assorbimento è inibito anche da legumi, soia e uova, il rischio di carenza di B12, creatina, taurina, EPA e DHA che potrebbero non essere privi di rischi.

Commento

Questo lavoro dimostra in modo competente che vi sono ancora molti punti da chiarire e approfondire prima di poter affermare che la dieta vegetariana o vegana, anche se ben impostata e supplementata, può sostituire la dieta onnivora nelle gravide e nei bambini. Tutto questo va spiegato alle famiglie: da un punto di vista scientifico non si può affermare che la dieta priva di carne sia senza alcun rischio in gravidanza, nell'allattamento e nei bambini in crescita.

Complementary Feeding: A Position Paper by the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition

Fewtrell M, Bronsky J, Campoy C, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2017;64(1):119-132

Il lavoro propone un'analisi circostanziata e aggiornata in merito alla alimentazione complementare - processo comunemente, ma erroneamente definito svezzamento - che comincia quando il latte materno non è più sufficiente da solo a soddisfare le esigenze nutritive del neonato ed è quindi necessario affiancare altri alimenti. Vengono in particolare affrontati i diversi aspetti relativi ai tempi dell'alimentazione complementare, con riferimento alla maturazione fisiologica delle funzioni renale e gastrointestinale, alle necessità nutrizionali nei diversi periodi, alle correlazioni tra alimentazione e

indicatori come il rischio di infezioni, le allergie alimentari, il manifestarsi di patologie quali la malattia celiaca, il diabete mellito di tipo 1 e l'obesità. Una parte rilevante è dedicata ad approfondire gli effetti sullo sviluppo psico-fisico e sulla salute di diversi tipi di dieta (vegetariana, vegana).
Vengono infine descritti le modalità e i diversi modelli di alimentazione complementare. Per ognuno dei settori affrontati sono riportate le conclusioni del Comitato per la nutrizione della European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN), vengono formulate raccomandazioni e si individuano le aree di approfondimento e ricerca prioritarie.

Commento

Gli alimenti complementari sono necessari sia dal punto di vista nutrizionale, sia per garantire una crescita adeguata e rappresentano una tappa importante nella transizione dall'allattamento verso l'alimentazione di famiglia. Il periodo di alimentazione complementare corrisponde ad una fase di rapida crescita e sviluppo nella quale i bambini sono particolarmente sensibili alle carenze e agli eccessi di nutrienti. Le relativamente limitate evidenze scientifiche nel settore si riflettono in una considerevole disomogeneità delle raccomandazioni e delle pratiche nelle diverse aree geografiche. Il lavoro aggiorna un precedente position paper del 2008 ed è particolarmente interessante in quanto esamina estesamente le nuove evidenze, compresi i risultati di studi clinici randomizzati sull'introduzione del glutine e degli alimenti allergizzanti. Analisi e raccomandazioni si riferiscono in particolare ai nati a termine sani nel la popolazione europea e le conclusioni descrivono in sintesi tempistiche, contenuto e modalità dell'alimentazione complementare. Oltre ad offrire una revisione sistematica della letteratura, gli autori affrontano argomenti quali le nuove tendenze in tema di nutrizione e i rischi connessi con carenze ed eccessi indotti da condizioni socioeconomiche, stili di vita, influenze culturali. Con riferimento alla questione di attualità rappresentata dalla dieta vegana, si sottolinea la necessità di una appropriata supervisione medica o nutrizionistica per gestire le indispensabili supplementazioni e chiarire ai genitori le serie conseguenze di un mancato stretto monitoraggio. Il rispetto e la valorizzazione degli aspetti positivi delle diverse culture e tradizioni sono costantemente al centro della comunicazione e della relazione fra professionisti e famiglie. Le indicazioni di carattere pratico sono fornite in modo chiaro ed esaustivo.

La Rivista delle Malattie Rare

ANNO II - N. 2 MAGGIO 2018
QUADRIMESTRALE DI ATTUALITA' IN MEDICINA

ISBN: 9788899343439

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

editore medpoint

Med Point srl
Via Giorgini, 16 - Milano
Tel. 02 3343281 - Fax 02 38002105
e-mail medpointsrl@medpointsrl.it - www.malattierare.eu
www.medpointsrl.it

Direttore Responsabile: Ida Tacconi
Redazione: Luca Annovazzi, Anna Invernizzi, Monica Luciani
Direzione grafica: Marcella Ronca
Segreteria di Redazione: Federica Rebora - federica.rebora@medpointsrl.it
Stampa: Magicgraph srl - Busto Arsizio (VA)

@ 2018 **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.

MALATTIE RARE

IL NOSTRO IMPEGNO PER COLO**RARE** IL FUTURO DI OGNI PAZIENTE



Da sempre abbiamo a cuore il futuro dei nostri pazienti.

Il nostro impegno nelle malattie rare ha reso possibile lo sviluppo di soluzioni terapeutiche in diverse aree quali l'endocrinologia, l'ematologia e la neurologia.

La nostra missione è quella di continuare a ricercare soluzioni innovative per il trattamento di altre patologie rare e contribuire a migliorare la vita dei pazienti e delle loro famiglie.

Pfizer

www.pfizer.it