

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA



TESI DI LAUREA

**Neuropatia da mutazione del gene SPTLC1 in età pediatrica:
correlazione genotipo-fenotipo e trial terapeutico con
supplementazione di L-serina**

RELATORE

Prof.ssa Chiara Fiorillo

CANDIDATO

Elena Bogliacino

CORRELATORE

Prof.ssa Marina Grandis

Anno accademico 2020 - 2021

Indice

Capitolo 1: Introduzione 1

NEUROPATIE PERIFERICHE.....	1
Generalità.....	1
Forme acquisite e su base genetica	2
NEUROPATIE E POLINEUROPATIE IN ETA' PEDIATRICA	3
Generalità.....	3
Polineuropatie acquisite.....	4
Polineuropatie su base genetica	4
Neuropatia delle piccole fibre	5
NEUROPATIE EREDITARIE SENSITIVE E AUTONOMICHE (HSAN)	7
Generalità.....	7
Forme	8
HSAN-I.....	10
Generalità.....	10
Forme	10
HSAN-IA	11
Storia della caratterizzazione clinica della patologia	11
Genetica	13
Patogenesi	17
Caratteristiche cliniche.....	28
Esami paraclinici.....	31
Terapia.....	38

Capitolo 2: Obiettivi della tesi 42

Capitolo 3: Materiali e metodi..... 43

PAZIENTI.....	43
ANALISI GENETICHE	44
SCALA CMT PEDIATRICA (CMTPedS).....	44
ALTRE VALUTAZIONI PER LO STUDIO DEL COINVOLGIMENTO DELLA COMPONENTE SENSITIVA.....	52
Valutazione sensibilità termica	52
Scala di Norfolk.....	53
Questionario DN4.....	56
VALUTAZIONE DEL COINVOLGIMENTO DEL SISTEMA NERVOSO AUTONOMO.....	57
COMPASS31 (Composite Autonomic Symptoms Score)	57
Risposta simpatico cutanea.....	58
RM MUSCOLARE	59
DOSAGGIO SFINGOLIPIDI SU SIERO	59
DOSAGGIO AMMINOACIDI PLASMATICI E URINARI	60
BIOPSIA DI NERVO	61
BIOPSIA DI CUTE	61
Studio delle piccole fibre.....	61

Studio su fibroblasti	63
DISEGNO TRIAL TERAPEUTICO CON SUPPLEMENTAZIONE DI L-SERINA	64
Capitolo 4: Risultati.....	67
PAZIENTI.....	67
SCALA CMT PEDIATRICA (CMTPedS).....	78
ALTRE VALUTAZIONI PER LO STUDIO DEL COINVOLGIMENTO DELLA COMPONENTE SENSITIVA.....	79
Valutazione sensibilità termica	79
Scala di Norfolk.....	79
Questionario DN4.....	81
VALUTAZIONE DEL COINVOLGIMENTO DEL SISTEMA NERVOSO AUTONOMO.....	82
COMPASS331 (Composite Autonomic Symptoms Score)	82
Risposta simpatico cutanea.....	84
RM MUSCOLARE	86
DOSAGGIO SFINGOLIPIDI SU SIERO	88
DOSAGGIO AMMINOACIDI PLASMATICI E URINARI	88
BIOPSIA DI NERVO	88
BIOPSIA DI CUTE	92
Studio delle piccole fibre.....	92
Studio su fibroblasti	95
Capitolo 5: Discussione e conclusioni.....	97
Bibliografia.....	110

Indice figure

FIGURA 1 CLASSIFICAZIONE DELLE NEUROPATIE EREDITARIE SENSITIVE E AUTONOMICHE (HSAN)	9
FIGURA 2 SPTLC1 MORBIDITY MAP	16
FIGURA 3 VIA METABOLICA DI SINTESI DE NOVO DEGLI SFINGOLIPIDI	18
FIGURA 4 REAZIONE DI SINTESI DEI DEOSSI-SFINGOLIPIDI CORRELATI AD HSAN-IA	23
FIGURA 5 LOCALIZZAZIONE ALL'INTERNO DELLA STRUTTURA CRISTALLINA DI SPT DI S331F E S331Y.	27
FIGURA 6 MECCANISMO DI REGOLAZIONE DEL COMPLESSO ENZIMATICO SPT	28
FIGURA 7 BIOPSIA DI NERVO HSAN-IA: 1	33
FIGURA 8 BIOPSIA DI NERVO HSAN-IA: 2	33
FIGURA 9 BIOPSIA DI NERVO HSAN-IA: 3	33
FIGURA 10: BIOPSIA DI CUTE DELLA COSCIA: ENFD PAZIENTE HSAN-IA (A) CONTROLLO (B)	35
FIGURA 11 SCHEDA CMTPEdS.....	45
FIGURA 12 FUNCTIONAL DEXTERITY TEST.....	47
FIGURA 13 NINE HOLE PEG TEST.....	47
FIGURA 14 PROVA DI FORZA DI FLESSIONE PLANTARE FIGURA 15 PROVA DI FORZA DI DORSIFLESSIONE PLANTARE.....	48
FIGURA 16 LIVELLI IPO-ANESTESIA PINPRICK.....	49
FIGURA 17 SCALA DI NORFOLK.....	55
FIGURA 18 QUESTIONARIO DN4.....	56
FIGURA 19 CARATTERISTICHE FENOTIPICHE PAZIENTE 1.....	72
FIGURA 20 CARATTERISTICHE FENOTIPICHE PAZIENTE 2.....	77
FIGURA 21 IMMAGINI RM MUSCOLARE COSCIA E GAMBA PAZIENTE 1.....	86
FIGURA 22 IMMAGINI RM MUSCOLARE COSCIA DISTALE PAZIENTE 2	87
FIGURA 23 IMMAGINI RM MUSCOLARE GAMBA DISTALE PAZIENTE 2.....	87
FIGURA 24 BIOPSIA DI NERVO PAZIENTE 1: 1 (A) TRICROMICA DI MALLORY, CROSS SECTION (B) MICROSCOPIA ELETTRONICA.....	90
FIGURA 25 BIOPSIA DI NERVO PAZIENTE 1: 2	91
FIGURA 26 BIOPSIA DI NERVO PAZIENTE 1: 3	91
FIGURA 27 BIOPSIA DI NERVO PAZIENTE 1: 4	92
FIGURA 28 ENFD (EPIDERMAL NERVE FIBER DENSITY): CONTROLLO SANO (A) E PAZIENTE 2 (B).....	93
FIGURA 29 GHIANDOLA SUDORIPARA: CONTROLLO SANO (A) E PAZIENTE 2 (B)	93
FIGURA 30 MUSCOLO ERETTORE DEL PELO: CONTROLLO SANO (A) E PAZIENTE 2 (B)	94
FIGURA 31 PANNELLO DI CONFRONTO RIASSUNTIVO CONTROLLO SANO, PAZIENTE 1 E PAZIENTE 2.....	95

Indice tabelle

TABELLA 1 SINTESI HSAN-I.....	11
TABELLA 2 SINTESI DOMINI E PUNTEGGI COMPASS331	57
TABELLA 3 SENSORY NCS PAZIENTE 1.....	68
TABELLA 4 MOTOR NCS PAZIENTE 1	69
TABELLA 5 SENSORY NCS PAZIENTE 2.....	74
TABELLA 6 MOTOR NCS PAZIENTE 2.....	74
TABELLA 7 PUNTEGGI CMTPEdS PAZIENTE 1 E PAZIENTE 2	78
TABELLA 8 RISULTATI COMPASS331 PAZIENTE 1.....	82
TABELLA 9 RISULTATI COMPASS331 PAZIENTE 2.....	83
TABELLA 10 TABELLA CONFRONTO CASI S331.....	101

Capitolo 1: Introduzione

NEUROPATIE PERIFERICHE

Generalità

Le neuropatie periferiche sono un gruppo eterogeneo di condizioni cliniche che colpiscono il sistema nervoso periferico.

Il sistema nervoso periferico è costituito da tre sistemi: motorio, sensitivo e autonomico.

La maggior parte dei nervi periferici sono misti e quindi provvisti di fibre motorie, sensitive e talvolta anche autonome. Per questo motivo le neuropatie periferiche possono comportare un quadro puro di deficit motorio, sensitivo oppure un quadro di combinazione di deficit delle varie componenti a seconda della composizione in fibre dei neuroni coinvolti nel processo patologico.

Le neuropatie periferiche rappresentano un problema neurologico estremamente frequente e polimorfo: si manifestano clinicamente in maniera assai variabile in base alla gravità e alla velocità di progressione del processo patologico, alle strutture anatomiche coinvolte, alla prevalente compromissione assonale o mielinica, alla sede preferenziale del danno e al tipo di patogenesi. [1]

Dal momento che la presentazione clinica e le cause alla base delle varie forme di neuropatia sono disparate, è necessario un approccio clinico logico e sequenziale nella valutazione e nella gestione del singolo paziente.

Attraverso la combinazione dell'obiettività clinica e dei risultati dei test laboratoristici e elettro-diagnostici, è possibile arrivare a classificare la maggior parte delle neuropatie, in particolare dal punto di vista eziopatogenetico. Tale classificazione consente una valutazione razionale della prognosi e delle opzioni di trattamento. [1]

Forme acquisite e su base genetica

Sulla base dell'eziologia le neuropatie periferiche si possono dividere in:

- Forme acquisite

Si tratta di un capitolo molto ampio che comprende forme traumatiche, infiammatorie autoimmuni, infettive, associate a patologia sistemica, carenziali, tossiche (da tossici industriali e ambientali, da farmaci), da agenti fisici, a eziologia indeterminata.

- Forme su base genetica (o ereditarie)

Costituiscono un eterogeneo e complesso gruppo di patologie genetiche, generalmente caratterizzate da un esordio insidioso nelle prime decadi di vita e da un decorso cronico. Il loro difficile inquadramento nosografico è stato significativamente incentivato nel corso degli ultimi decenni dall'identificazione di numerosi geni alla base di specifici quadri clinici.

In questo elaborato verranno trattate le neuropatie ereditarie ad esordio pediatrico.

NEUROPATIE E POLINEUROPATIE IN ETA' PEDIATRICA

Generalità

Le neuropatie e le polineuropatie in età pediatrica rappresentano un capitolo estremamente complesso e interessante. Esse presentano alcune differenze rispetto alle forme che interessano l'età adulta, in particolare dal punto di vista epidemiologico. In generale, la variabilità intrinseca delle neuropatie periferiche e la frequente mancanza di precisi criteri diagnostici rende la valutazione epidemiologica estremamente complessa.

Nel bambino le neuropatie su base ereditaria sono più frequenti rispetto alle forme acquisite, rappresentando circa i 2/3 della casistica totale, dal momento che molte patologie metaboliche e degenerative del sistema nervoso centrale e periferico hanno insorgenza in età pediatrica e il coinvolgimento del sistema nervoso periferico rappresenta spesso parte del quadro sindromico.

Nell'adulto invece le forme acquisite associate a patologia sistemica (diabete mellito, paraproteinemie, sindromi paraneoplastiche), molto rare nel bambino, rappresentano la causa più comune di neuropatia periferica, soprattutto nei Paesi sviluppati. In particolare la neuropatia diabetica secondaria a diabete mellito è la forma più frequentemente osservata, sia a causa dell'elevata prevalenza di questa condizione metabolica, sia per il frequente coinvolgimento del SNP all'interno del quadro delle sue complicanze.

Polineuropatie acquisite

Le polineuropatie acquisite si dividono in:

- Forme verosimilmente immuno-mediate

Fanno parte di questa categoria la sindrome di Guillàn-Barrè (GBS), la polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica (CIDP), la sindrome di Miller-Fisher (SMF) e la polineuropatia da critical illness (CIP).

La GBS rende conto della maggior parte delle forme acquisite in età pediatrica.

- Polineuropatie da tossici

Appartengono a questa seconda categoria tutte le neuropatie causate dall'effetto tossico di sostanze esogene sui nervi periferici, che portano tipicamente a danno assonale. Esempi di sostanze che possono portare a questo tipo di condizione clinica sono alcuni chemioterapici (come oxaliplatino, cisplatino, talidomide e vincristina), metalli pesanti, tossine di origine alimentare e pesticidi organofosfati.

Polineuropatie su base genetica

La principale classificazione divide le neuropatie su base genetica in due gruppi:

- Polineuropatie ereditarie con unico o prevalente interessamento dei nervi periferici (HN)

Questo gruppo viene ulteriormente suddiviso in:

- Neuropatie ereditarie motorie e sensitive o HMSN (Hereditary Motor and Sensory Neuropathies), meglio note come “Malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT)”

- Neuropatie sensitive ereditarie o HSN (Hereditary Sensory Neuropathies)
- Neuropatie ereditarie sensitive e autonome o HSAN (Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathies)
- Polineuropatie ereditarie facenti parte di un disturbo metabolico o di una condizione degenerativa interessante il sistema nervoso centrale e periferico

Questo secondo gruppo viene ulteriormente suddiviso in:

- Polineuropatie ereditarie parte di un disturbo metabolico congenito
 Alcune delle patologie metaboliche congenite che possono presentare una polineuropatia all'interno del quadro sindromico sono le malattie lisosomiali (es. malattia di Krabbe, malattia di Fabry), le malattie perossisomiali (es. adrenoleucodistrofia), le malattie del metabolismo lipidico, le malattie mitocondriali, le amminoacidopatie.
- Polineuropatie ereditarie parte di una condizione degenerativa interessante il sistema nervoso
 Una polineuropatia periferica può manifestarsi nel contesto di atassie spinocerebellari (es. atassia di Friedrich) e nelle paraplegie spastiche ereditarie (HSP).

Neuropatia delle piccole fibre

La neuropatia delle piccole fibre (SFN) è una forma particolare di neuropatia periferica che può associarsi ad altri quadri di neuropatia ma anche ad altre condizioni

patologiche (es. diabete mellito, connettivopatie, deficit di vitamina B12, infezioni, sindromi paraneoplastiche).

Si tratta di un disordine neurologico che colpisce prevalentemente le fibre nervose di nervi periferici di piccolo diametro. Il quadro clinico dei pazienti tipicamente si caratterizza per un importante impatto sulla qualità della vita secondario alla presenza di parestesie, dolore neuropatico, riduzione della sensibilità termodolorifica e sintomi autonomici.

La biopsia di cute rappresenta il gold standard diagnostico e serve per mettere in evidenza la densità delle piccole fibre intraepidermiche (IENFD). [2]

NEUROPATIE EREDITARIE SENSITIVE E AUTONOMICHE (HSAN)

Generalità

Le HSAN (hereditary sensory and autonomic neuropathies) comprendono un gruppo di neuropatie ereditarie molto rare, caratterizzate da prevalente degenerazione dei neuroni ganglionari sensitivi e autonomici paravertebrali simpatici di piccole dimensioni, a cui può associarsi anche il coinvolgimento della componente motoria.

Si tratta di un ventaglio di neuropatie estremamente eterogeneo sia dal punto di vista clinico sia genetico.

Clinicamente, la caratteristica tipica di queste neuropatie è il fatto che i deficit sensitivo e autonomico prevalgono su quello motorio. Questa caratteristica le differenzia in maniera significativa dalle CMT, gruppo di neuropatie notevolmente più frequente in cui il disturbo motorio domina il quadro clinico.

In letteratura, Nelaton è stato il primo a descrivere, in un case report pubblicato nel 1852, tre fratelli che, tra la II e la V decade di vita, hanno sviluppato un quadro clinico caratterizzato da ulcere plantari neurotrofiche. [3]

Negli anni '70 del secolo scorso, lo studio di famiglie affette da quadri ereditari caratterizzati da deficit sensitivo distale degli arti inferiori, ulcere non dolenti e fratture in giovane età, ha dato la spinta per intraprendere indagini genetiche ed eziopatologiche, portando alla progressiva costruzione di una classificazione che inizialmente ha categorizzato questa forma di neuropatia periferica con il nome di "neuropatia sensitiva ereditaria (HSN)". Il termine HSAN è stato coniato successivamente per mettere l'accento sul ruolo dell'alterazione del sistema autonomico all'interno del quadro clinico dei pazienti affetti da questa condizione,

grazie alla sempre maggiore consapevolezza riguardo il ruolo delle piccole fibre nelle funzioni autonome. [4]

Forme

Oggi si distinguono 8 forme di HSAN (HSAN-I - HSAN-VIII), alcune delle quali sono ulteriormente sottoclassificate: HSAN-I comprende 6 sottogruppi (HSAN-IA - HSAN-IF) e HSAN-II ne comprende 4 (HSAN-IIA - HSAN-IID).

La classificazione si basa sul pattern di ereditarietà (autosomica dominante o autosomica recessiva), sulla presenza di mutazioni genetiche specifiche e sulle caratteristiche cliniche predominanti.

In tabella sono riassunti dati riguardo il tipo di trasmissione, la decade di insorgenza della patologia, il locus e il gene di interesse, il fenotipo e alcuni elementi concernenti la diagnostica strumentale e bioptica.

Table 1 Hereditary sensory and autonomic neuropathies (HSANs)

HSAN types and other names	Inheritance	Onset decade	Locus	Gene	Phenotype	Diagnostic abnormalities (NCS, QST, HT, autonomic testing)	Nerve and skin punch biopsy
HSAN-IA/HSNI	AD	2nd-4th	9q22.2	<i>SPTLC1</i>	Loss of pain/temperature sensation; lancinating pain; self-mutilation; ± sweat disturbance; distal weakness + GERD; cough	Reduced CMAP and SNAP amplitudes; abnormal temperature threshold on QST; absent axon flare on HT; cardiovagal and cardio-sympathetic impairment, absent distal QSART response; absent SSR	Distal small unmyelinated greater than proximal large fibers loss; absent or reduced epidermal nerve fibers in the distal with relative preservation in the thigh
HSAN-IB	AD	2nd	3p22-p24				
HSAN-IC	AD	2nd	14q24.3	<i>SPTLC2</i>			
HSAN-ID	AD	2nd	14q22.1	<i>ATL1</i>	+ Trophic skin/nails; variable UMN		
HSAN-IE	AD	2nd	19p13.2	<i>DNMT1</i>	+ SNHL; early dementia		
HSAN-IF	AD	2nd	11q13.1	<i>ATL3</i>			
HSAN-IIA	AR	1st	12p13.3	<i>WNK1</i>			
HSAN-IIB	AR	Birth	5p15.1	<i>FAM134B</i>	Loss of pressure/vibration	Absent SNAP; normal to reduced CMAP amplitudes; abnormal vibration and temperature thresholds on QST; mild axon flare on HT	Absent large myelinated fibers; mild loss of small unmyelinated fibers
HSAN-IIC	AR	Birth	2q37	<i>KIF1A</i>	> pain/temperature; impotence; impaired bladder function; areflexia		
HSAN-IID/CIP1	AR	Birth	2q24.3	<i>SCN9A</i>			
HSAN-III, familial dysautonomia, Riley-Day syndrome	AR	Birth	9q31	<i>IKBKAP/ELP1</i>	Loss of pain/temperature more than pressure/vibration; dysautonomia, vomiting crisis; absent lingual fungiform papillae; alacrima; absent reflexes; postural hypotension; hyperhidrosis	Reduced amplitudes of SNAPs; abnormal temperature and vibration QST; absent axon flare on HT; cardiovagal and cardio-sympathetic impairment; orthostatic hypotension	Similar to HSAN-I
HSAN-IV, CIPA	AR	Birth	1q23.1	<i>NTRK1</i>	Global anhidrosis; hyperpyrexia; ID; insensitivity to pain; self-mutilation	Similar to HSAN-I	Similar to HSAN-I
HSAN-V	AR	Birth	1p13.2	<i>NGF3</i>	Impaired deep pain and loss of pain/temperature > touch/vibration	Similar to HSAN-I with mixed axon flare on HT	Similar to HSAN-I
HSAN-VI	AR	Birth	6p12.1	<i>DST</i>	Severe dysautonomia; impaired pain/temperature > touch/vibration; self-mutilation; distal contractures	Similar to HSAN-I	Similar to HSAN-I
HSAN-VII, CIP2	AD	Birth	3p22.2	<i>SCN11A</i>	Hyperhidrosis; pruritis; self-mutilation, GI dysmotility	Similar to HSAN-I	None
HSAN-VIII, CIP3	AR	Birth	9q34.12	<i>PRDM12</i>	Loss of pain/temperature sensation; hypohidrosis; fevers; self-mutilation	Similar to HSAN-I with normal autonomic testing	Similar to HSAN-I

AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; *ATL1*, Atlastin GTPase 1; CIP, congenital insensitivity to pain; CIPA, congenital insensitivity to pain with anhidrosis; CMAP, compound muscle action potential; *DNMT1*, DNA methyltransferase 1; *DST*, dystonin; *ELP1*, elongator complex protein 1; HT, histamine test; GERD, gastroesophageal reflux; GI, gastrointestinal; HSN, hereditary sensory neuropathy; ID, intellectual disability; *IKBKAP*, inhibitor of kappa light polypeptide enhancer in B cells-kinase complex associated protein; *KIF1A*, kinesin family member 1A; NCS, nerve conduction studies; *NGF3*, nerve growth factor 3; *NTRK1*, neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1; QST, quantitative sensory testing; *RAB7*, RAS-associated protein RAB7; *SCN9A*, sodium voltage-gated channel alpha subunit 9; SNAP, sensory nerve action potential; SNHL, sensorineural hearing loss; *SPTLC1*, serine palmitoyltransferase long-chain base unit 1; SSR, sympathetic skin response; UMN, upper motor neuron; *WNK1*, With-No lysine kinase or lysine-deficient protein kinase

Figura 1 Classificazione delle neuropatie ereditarie sensitive e autonome (HSAN) [5]

HSAN-I

Generalità

La neuropatia sensitiva e autonoma ereditaria di tipo 1 (HSAN-I) è una patologia neurologica autosomica dominante progressiva e debilitante, caratterizzata dalla presenza di una neuropatia sensitiva con variabile coinvolgimento del sistema autonomo e motorio. Negli ultimi anni è stata riscontrata anche la presenza di una neuropatia delle piccole fibre (SFN), che contribuisce alla determinazione di alcuni dei sintomi cardine della patologia.

Presenta generalmente esordio in età adulta, in particolare tra la II e la IV-V decade di vita, e decorso lento. Sono tuttavia stati descritti casi con esordio congenito o in età pediatrica che tipicamente si accompagnano a fenotipi di patologia più severi.

Si caratterizza agli studi elettrofisiologici come una polineuropatia assonale lunghezza-dipendente sensitiva e motoria, con alcune caratteristiche demielinizzanti. Alla biopsia di nervo mostra prevalente e severa degenerazione delle fibre mieliniche e relativa maggiore conservazione delle fibre amieliniche (vedi paragrafo “Esami paraclinici”).

Forme

Oggi si distinguono sei sottogruppi di HSAN-I, che si differenziano sulla base del gene mutato e del quadro clinico conseguente (**Tabella 1** [6]).

Le mutazioni genetiche responsabili delle diverse forme di HSAN-I sono: SPTLC1 (HSAN-IA e HSN1B), SPTLC2 (HSAN-IC), ATL1 (HSAN-ID), DNMT1 (HSAN-IE) e ATL3 (HSAN-IF), in accordo con la classificazione fornita da www.omim.org/.

HSAN	Trasmissione	Gene/Locus	Esordio	Sintomatologia principale
IA	AD	SPTLC1 9q22.31	II-III decade	Ipo-anestesia termodolorifica, dolore neuropatico (folgorante, urente), acropatia ulcero-mutilante, artropatia neurotrofica
IB	AD	3p24-p22	II-III decade	Reflusso gastro-esofageo, tosse, ipoacusia bilaterale, dolori lancinanti, alacrimia, deficit erettile
IC	AD	SPTLC2 14q24.3	I-III decade	Ipo-anestesia globale areflessica, acropatia ulcero-mutilante, anidrosi
ID	AD	ATL1 14q22.1	II-III decade	Ipo-anestesia globale, dolori folgoranti, iperreflessia profonda, spasticità
IE	AD	DNMT1 19p13.2	II-III decade	Ipo-anestesia termodolorifica, dolore neuropatico, acropatia ulcero-mutilante, sordità, demenza
IF	AD	ATL3 11q13.1	I-II decade	Ipo-anestesia globale tatto-termodolorifica, ulcerazioni/fratture

Tabella 1 Sintesi HSAN-I [6]

HSAN-IA

HSAN-IA è, seppur rara, la più comune tra le sei forme di neuropatia ereditaria sensitiva e autonoma. È stata anche la prima forma riguardo cui sono stati condotti studi genetici per l'identificazione del gene responsabile, in modo da poter approfondire l'eziopatogenesi alla base della patologia.

Storia della caratterizzazione clinica della patologia

Le prime descrizioni di pazienti con quadri clinici riconducibili a quella che oggi noi chiamiamo HSAN-I risalgono ai primi decenni del secolo scorso.

Le prime casistiche riportate in letteratura riguardavano casi di ulcere plantari neurotrofiche mutilanti con carattere di ereditarietà senza descrizione di ulteriore sintomatologia associata [3].

Hicks nel 1922 ha descritto 10 membri di una famiglia inglese affetti da una condizione non meglio identificata, con esordio tra i 15 e i 36 anni, caratterizzata dalla presenza di ulcere indolori mutilanti acrali, dolore neuropatico lancinante, ipo-anestesia termodolorifica prevalentemente distale, iporeflessia. Questi segni e sintomi erano nettamente prevalenti a livello degli arti inferiori. Il quadro neurologico descritto si

associava a progressiva sordità bilaterale. Hicks ha sottolineato come il quadro clinico fosse praticamente sovrapponibile tra i soggetti affetti, ipotizzando quindi una matrice ereditaria della patologia. [7]

Nel 1951 Denny-Brown ha pubblicato il case report di una donna di 54 anni, membro della famiglia descritta da Hicks, descrivendone i dati clinici e i risultati autoptici. La storia clinica era coerente con il quadro di malattia delineato nello studio del 1922 ma l'elemento di novità di questo studio consisteva nella descrizione del riscontro autoptico che evidenziava una marcata perdita di neuroni gangliari della radice dorsale nei tratti lombare e sacrale e la presenza di corpi ialini nelle cellule gangliari superstiti. I segmenti cervicale e dorsale risultavano conservati. [8]

Nei decenni successivi sono stati pubblicati diversi lavori in cui venivano descritte famiglie con quadri clinici più o meno sovrapponibili, talvolta arricchiti con la descrizione di qualche altro elemento quali l'artropatia neuropatica descritta da Mandell e Smith [9], l'atrofia muscolare peroneale e il piede cavo descritti in una famiglia da Dyck [10], l'amiotrofia descritta da Campbell e Hoffman [11] in uno studio del 1964 e da DeLeòn in uno studio del 1969 [12].

Un ulteriore passo avanti nella conoscenza e nella definizione della patologia è stato compiuto nel 1992 quando Hageman e il suo gruppo di ricerca hanno pubblicato un importante case report riportando i risultati di test audiometrici, valutazione delle funzioni del sistema autonomo, elettromiografia, stimolazione magnetica intracranica e RM cerebrale condotte su un paziente affetto da HSN1. Queste valutazioni hanno

dimostrato l'assenza di coinvolgimento del sistema nervoso centrale e hanno permesso di individuare come bersaglio di HSN1 i gangli della radice dorsale e i nervi periferici. È stato inoltre sottolineato il possibile coinvolgimento dei nervi motori (senza interessamento delle vie motorie centrali). [13]

Nicholson e il suo gruppo di ricerca, nello stesso studio che - come vedremo nel paragrafo successivo - per primo si è occupato di mappare il gene responsabile di HSAN-IA, hanno descritto con precisione lo spettro clinico di questa condizione patologica, caratterizzato da compromissione sensitiva e motoria, studiando i membri affetti di 4 famiglie australiane. [14]

In uno studio di Dubourg, pubblicato nel 2000, sono stati descritti dal punto di vista clinico ed elettrofisiologico 6 membri di una famiglia francese affetti da neuropatia ereditaria, già definita HSAN-1, sottolineando il coinvolgimento sensitivo, autonomico e motorio all'interno del quadro clinico [15].

Nell'ultimo decennio sono stati pubblicati diversi studi riguardo una forma di HSAN-IA congenita o comunque a insorgenza in età pediatrica che si caratterizza per un fenotipo particolarmente severo, che verranno però trattati più avanti perché di fondamentale importanza nell'ambito di questo lavoro [16] [17] [18] [19] [20].

Genetica

Il primo studio che si è occupato di mappare il gene responsabile di HSAN-IA risale al 1996. Nicholson et al. hanno condotto uno studio del linkage sull'intero genoma in quattro famiglie australiane affette da HSN, descritte dal punto di vista clinico in alcuni

studi precedenti. Hanno identificato il locus malattia (HSAN-I) su una regione di 8-centiMorgan (cM) sul cromosoma 9, in particolare nella regione cromosomica 9q22.1-9q22.3 suggerendo quindi quali possibili geni alla base della malattia quelli già descritti in quella particolare regione cromosomica [14].

Nel 1997 uno studio successivo condotto da Blair et al. ha rifinito il mapping, restringendo l'area di interesse a un intervallo di 3-4 cM della regione 9q22.1-9q22.3 e ha escluso quali geni alla base della patologia GAS1, XPA e altri descritti nell'intervallo identificato in letteratura e quindi candidati ad avere un ruolo nella patogenesi della patologia [21]. Altri studi, uno dei quali condotto sempre da Blair l'anno successivo e un altro condotto da Bejaoui et al. nel 1999, hanno sostanzialmente confermato quanto riscontrato negli studi precedenti, approfondendo alcuni aspetti riguardo un'identificazione più precisa del locus di interesse. [22] [23]

Nel 2001 Dawkins e il suo gruppo di lavoro hanno pubblicato i risultati di uno studio condotto su 11 famiglie, identificando nei membri affetti una mutazione missenso in eterozigosi del gene SPTLC1 che, nello stesso studio, è stato mappato a livello del locus 9q22.1-9q22.3. Hanno inoltre determinato la presenza di 15 esoni all'interno del gene. Lo screening delle mutazioni condotto sui loro pazienti ha messo in evidenza tre mutazioni a carico di due differenti esoni: due mutazioni sull'esone 5 - mutazione **p.C133Y** in una famiglia e mutazione **p.C133W** in otto famiglie - e la mutazione **p.V144D** sull'esone 6 presente in due famiglie. Nello stesso studio sono stati approfonditi aspetti riguardo la patogenesi di HSAN-I che verranno presi in considerazione nel paragrafo dedicato [24].

Nello stesso anno Bejaoui e il suo gruppo di ricerca hanno analizzato l'intera sequenza di SPTLC1 in membri affetti da HSAN-I appartenenti ad 8 famiglie e in 2 di esse hanno identificato due delle mutazioni osservate anche dal gruppo di Dawkins: una famiglia presentava la mutazione p.C133Y e l'altra la mutazione p.C133W. [25]

Nel 2004 Verhoeven et al. hanno identificato la mutazione **p.G387A** a carico di un altro codone di SPTLC1 in due gemelle belghe affette da HSAN-I [26]. Tuttavia, in studi successivi, è emerso che non si tratta di una mutazione patogenetica dal momento che, oltre a non interferire con la formazione del complesso enzimatico SPT, codificato da SPTLC1, non ha neppure mostrato alcun effetto sull'attività di SPT. È stato quindi dedotto che non si tratti di una mutazione patogenetica, quanto piuttosto di un polimorfismo raro non direttamente associato a HSAN-I, ma che potrebbe avere effetto indiretto conferendo un aumento del rischio di malattia in combinazione con la presenza di un'altra mutazione significativa [27].

Nel 2009 Rotthier e il suo gruppo di ricerca hanno descritto le mutazioni **p.A352V** e **p.S331F**, quest'ultima presente in un paziente francese con fenotipo particolarmente severo a insorgenza congenita [17].

Nel 2009 da Rautenstrauss et al. è stata poi descritta la mutazione SPTLC1 **p.C133R** [28].

In uno studio di Auer-Grumbach pubblicato nel 2013 [18] viene riportato un altro caso di paziente affetto da mutazione p.S331F, già precedentemente segnalato in uno

studio di Huehne et al. [16]. Nello stesso articolo è stata inoltre descritta per la prima volta la mutazione **p.S331Y**, a livello dello stesso codone. Anche in questo caso il paziente presentava un esordio precoce e un fenotipo molto grave.

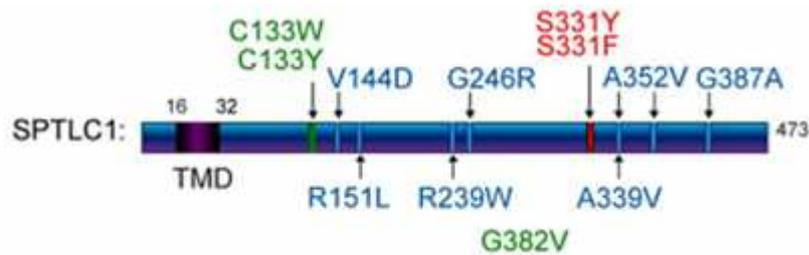


Figura 2 SPTLC1 morbidity map [29]

È importante sottolineare come recentemente siano state segnalate le mutazioni in S331 per il precoce onset di malattia e il fenotipo particolarmente severo (vedi paragrafo “Caratteristiche cliniche” – Capitolo 1). Per questi motivi oggi in letteratura si inizia a parlare di “S331 syndrome” [18] [19] [20].

Ad oggi in letteratura sono stati segnalati solo cinque casi di pazienti pediatriche affetti da questa forma di HSAN-IA con riscontro della mutazione SPTLC1 S331, due con mutazione p.S331Y [18] [20] e tre con mutazione p.S331F [16] [17] [19].

Le due pazienti al centro del nostro studio presentano mutazioni del gene SPTLC1 proprio a livello del codone S331: in particolare la paziente 1 presenta la mutazione p.S331Y mentre la paziente 2 la mutazione p.S331F.

Patogenesi

Il gene SPTLC1 codifica per la subunità 1 a catena lunga della serina palmitoil-transferasi (SPT), enzima chiave nel primo e limitante step della sintesi de novo degli sfingolipidi (**Figura 3**) che catalizza la condensazione, piridossal-5'-fosfato dipendente, di L-serina e palmitoil-CoA [30].

Gli sfingolipidi sono molecole anfipatiche, appartenenti alla categoria dei fosfolipidi, presenti nelle cellule eucariotiche, nelle quali rappresentano un'importante frazione dei lipidi di membrana. Lo scheletro molecolare è rappresentato dalla sfingosina, un amminoalcol insaturo. A questa è legato, tramite legame carboamidico, un acido grasso.

Fanno parte degli sfingolipidi tre categorie importanti di molecole lipidiche: ceramidi, sfingomieline e glicolipidi.

Il ruolo di queste biomolecole non è soltanto strutturale; oltre a rappresentare componenti importanti della membrana plasmatica, hanno un ruolo importante nel regolare alcuni processi biologici quali l'endocitosi, il ciclo cellulare, la risposta cellulare allo stress e l'apoptosi. Da questo si deduce che una mutazione a livello dell'enzima responsabile della prima reazione della via metabolica di sintesi degli sfingolipidi avrà delle ripercussioni fisiopatologiche e quindi cliniche importanti.

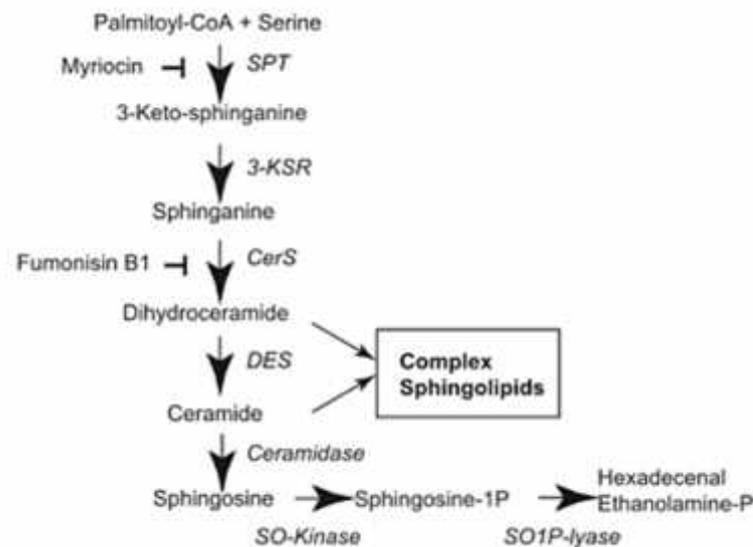


Figura 3 Via metabolica di sintesi de novo degli sfingolipidi [31]

Ad oggi, si parla del *complesso enzimatico SPT*, composto da componenti con funzione catalitica (SPTLC1 e SPTLC2) e componenti con funzione regolatoria (ssSPTa e ORMDL3).

Più precisamente, l'enzima SPT è costituito da 2 subunità principali, entrambe necessarie per l'attività dell'enzima: la subunità 1 (SPTLC1 o LCB1), codificata dal gene SPTLC1, la cui mutazione è responsabile di HSAN-IA e HSAN-IB (9q22.31) e la subunità 2 (SPTLC2 o LCB2), codificata dal gene SPTLC2, la cui mutazione è responsabile di HSAN-IC.

In un lavoro pubblicato nel 2006 da Hornemann et al. è stata descritta la subunità SPTLC3, definita isoforma di SPTLC2 in quanto mostra con questa un'omologia del 68%. In questo lavoro si ipotizza che, data la simile struttura di SPTLC2 e SPTLC3 e data la variabile espressione dell'una o dell'altra forma nei diversi tessuti in cui avviene la biosintesi (SPTLC3 è espressa in particolare a livello del tessuto placentare e delle linee

cellulari trofoblastiche), anche quest'ultima subunità identificata formi dimeri con SPTLC1. Inoltre è stato dimostrato che la sovraespressione di SPTLC3 è correlata a un aumento della funzione di SPT e che, al contrario, il silenziamento dell'espressione di questa terza subunità si correla ad una riduzione dell'attività enzimatica. Questi dati hanno portato ad ipotizzare che la variabile espressione delle due isoforme potrebbe essere correlata al meccanismo cellulare finalizzato alla regolazione dell'attività di SPT a seconda delle necessità dei vari tessuti. [32]

Uno studio pubblicato nel 2009 da Han e il suo gruppo di ricerca introduce il concetto di complesso enzimatico SPT descrivendo due isoforme, ssSPTa e ssSPTb, di un'ulteriore subunità enzimatica deputata alla regolazione dei componenti catalitici del complesso (SPTLC1 e SPTLC2). In questo studio viene dimostrato che queste subunità giocano un ruolo importante per la massima attività di SPT. [33]

La presenza di mutazioni a carico del gene SPTLC1 porta a un cambiamento della specificità del complesso enzimatico SPT che dimostra una ridotta affinità per il substrato canonico L-serina e una maggiore affinità per substrati alternativi quali L-alanina e glicina, con la conseguente formazione di una classe atipica di sfingolipidi neurotossici: 1-desossi-sfingolipidi (1-deoxySLs).

Coerentemente con quanto appena affermato i livelli di 1-deoxySLs sono patologicamente aumentati nei pazienti che presentano una delle mutazioni di SPTLC1 descritte nel paragrafo precedente.

Nel corso del tempo sono stati condotti diversi studi nel tentativo di comprendere la fisiopatogenesi alla base di HSAN-I.

Alcuni studi pubblicati nei primi anni 2000 hanno messo in evidenza che le ceramidi prodotte a seguito del catabolismo della sfingomieline mediano la morte cellulare programmata e che quindi l'aumento della sintesi de novo delle stesse, secondario all'aumentata attività enzimatica di SPT dato dalla mutazione genetica, causa aumento dell'apoptosi a livello di alcuni tessuti, comprese le cellule neuronali in via di differenziamento [34] [35] [24].

Dawkins e il suo gruppo di ricerca, nello studio già citato nel paragrafo precedente, hanno riscontrato che le mutazioni di SPTLC1 da loro descritte erano associate ad un aumento della sintesi di glicosil-ceramidi de novo in linee di linfoblasti dei pazienti con conseguente innesco di processi apoptotici, causa di massiccia morte cellulare durante la chiusura del tubo neurale. Quest'evidenza avvalorava l'ipotesi secondo cui la degenerazione nervosa in HSAN-I è dovuta a morte cellulare apoptotica indotta da ceramidi. [24]

Nell'anno successivo Bejaoui et al. hanno pubblicato un altro lavoro riguardo la patogenesi della malattia, condotto sia su linee cellulari CHO (Chinese hamster ovary) con mutazione di SPTLC1, sia su linee di linfoblasti derivati da pazienti HSAN-I, arrivando a conclusioni contrastanti rispetto allo studio precedente. Hanno osservato che le mutazioni di SPTLC1 fino a quel momento descritte in letteratura comportavano una riduzione dell'attività di SPT e quindi della sintesi degli sfingolipidi.

Essi hanno quindi ipotizzato che, oltre all'effetto negativo esercitato sull'attività di SPT, la mutazione di SPTLC1 potesse portare anche all'accumulo della forma mutata di LCB1, con conseguente azione tossica sui neuroni secondaria all'accumulo.

Bejaoui e il suo gruppo hanno quindi concluso che, sulla base dei loro riscontri, un'eventuale supplementazione di sfingolipidi avrebbe potuto prevenire o ritardare la comparsa dei sintomi dei pazienti portatori di mutazioni HSAN-I. [36]

Dedov in uno studio pubblicato nel 2004 ha messo in evidenza il problema delle discrepanze riguardo gli effetti della mutazione SPTLC1 sulla sintesi degli sfingolipidi, dal momento che erano stati pubblicati sia studi che sostenevano l'aumento dell'attività di SPT, sia studi che sostenevano, al contrario, una sua riduzione. Il suo lavoro ha mostrato che l'attività di SPT nelle cellule HSAN-I è ridotta di circa il 50%. Dedov ha evidenziato come questa riduzione sembrasse avere effetti minimi sul metabolismo degli sfingolipidi e la vitalità cellulare, elementi che potevano spiegare l'onset della malattia in II-IV decade di vita. Ha inoltre ipotizzato che forse l'espressione di SPTLC1 e 2 non sia ben bilanciata nei neuroni che invecchiano, cellule che per questi motivi risentono maggiormente di alterazioni nel metabolismo degli sfingolipidi ed eventualmente dell'accumulo di metaboliti anomali [37].

McC Campbell nel 2005 ha dimostrato una riduzione in vivo dell'attività di SPT del 60% in topi transgenici che sviluppavano una neuropatia lunghezza dipendente caratterizzata da iperpatia, deficit motori e alterazione dell'innervazione viscerale. Ha inoltre dimostrato l'effetto paradossale di questa riduzione sui livelli di ceramide che non

risultavano ridotti come ci si sarebbe aspettati. Al contrario, i livelli di C16:0 e C18:0, due ceramidi a lunga catena, risultavano aumentati forse a causa di un eccesso di disponibilità di acido palmitico secondario alla riduzione dell'attività di SPT.

McCampbell ha ipotizzato che livelli aumentati di queste ceramidi potessero giocare un ruolo nella degenerazione neuronale nei topi transgenici, dal momento che aumentati livelli degli stessi sono stati riscontrati nei neuroni "malati" di pazienti affetti da SLA, malattia di Alzheimer e demenza associata ad HIV. [38]

Eichler nel 2009 [39] e Penno nel 2010 [31] hanno pubblicato due studi di fondamentale importanza riguardo la patogenesi di HSAN-IA. Entrambi sono partiti dal presupposto che la riduzione dell'attività di SPT non poteva essere da sola sufficiente a spiegare la patogenesi di questa forma di neuropatia, dal momento che topi eterozigoti knock-out per SPTLC1 hanno un'attività SPT significativamente ridotta ma non sviluppano segni di neuropatia.

I due ricercatori hanno identificato come base patogenetica della malattia il guadagno di funzione di SPT con la conseguente produzione dei metaboliti atipici neurotossici, piuttosto che il deficit di biosintesi di sfingolipidi.

In particolare il riscontro della presenza di metaboliti lipidici atipici neurotossici [38] fornisce un'ipotesi alternativa per spiegare la base molecolare della patologia. Questi due studi sostengono infatti l'ipotesi secondo cui una mutazione significativa di SPTLC1 induca un'alterazione del sito attivo dell'enzima, portando a uno shift nella specificità del substrato di SPT. L'enzima dimostra infatti ridotta affinità per la L-serina e

maggiore affinità per L-alanina e glicina. Dalla condensazione del palmitoil-CoA con questi due amminoacidi alternativi si ottiene la formazione e il conseguente accumulo di due basi deossi-sfingoidi atipiche (DSBs): 1-deossi-sfinganina (deoxy-SA: m18:0), dalla condensazione con l’alanina, e 1-deossimetil-sfinganina (deoxy-methyl-SA: m17:0), dalla condensazione con la glicina (**Figura 4**).

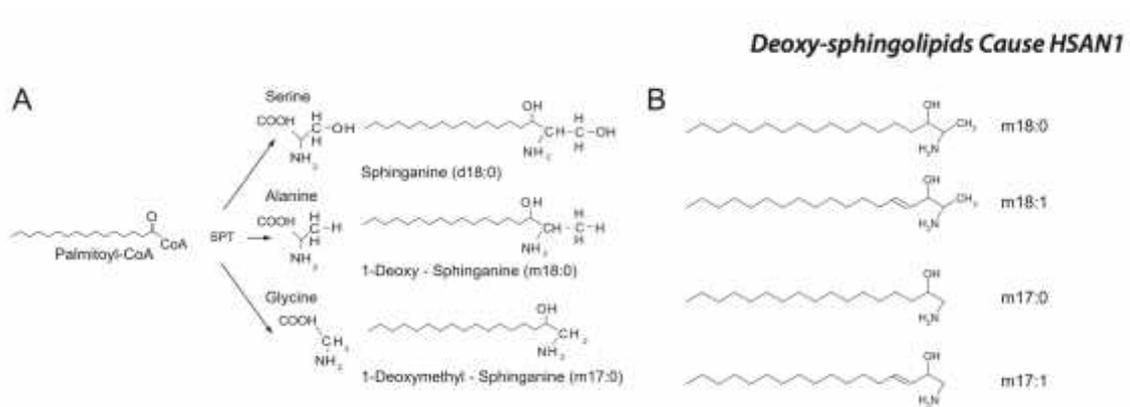


Figura 4 Reazione di sintesi dei deossi-sfingolipidi correlati ad HSAN-I [31]

Entrambi questi metaboliti mancano del gruppo idrossile C1 della sfinganina, essenziale per la conversione in sfingolipidi complessi (come sfingomieline e gangliosidi) e per la fosforilazione necessaria alla degradazione. Questo comporta l’accumulo di DSBs all’interno delle cellule dove vengono prodotti.

Quindi, secondo Eichler e Penno, HSAN-I è il risultato di una mutazione con guadagno di funzione che porta all’accumulo di metaboliti tossici. [39] [31]

Eichler e il suo gruppo di ricerca hanno riscontrato che i DSBs erano significativamente elevati nel plasma, nel nervo sciatico e nei testicoli dei topi tgSPTLC1C133W rispetto ai topi WT. Non sono state individuate invece differenze dei livelli di DSBs nel sistema nervoso centrale tra i due gruppi di topi. Il riscontro dell’accumulo dei metaboliti

tossici a livello del SNP e non nel SNC è coerente con il pattern di coinvolgimento clinico di HSAN-I. [39]

Penno et al. hanno riscontrato elevate concentrazioni di DBSs anche a livello dei linfoblasti dei pazienti e hanno dimostrato che la supplementazione di questi deossisfingolipidi atipici in colture di neuroni dei gangli della radice dorsale di embrioni di pollo, porta a effetti neurotossici sulla formazione dei neuriti in vitro; in particolare la neurotossicità è stata associata all'interferenza nella formazione dei neurofilamenti, quindi del citoscheletro neuronale. [31]

Una conferma riguardo la neurotossicità di queste molecole è data da studi clinici sul cancro in fase I in cui 1-deoxySA è stato testato come un nuovo farmaco sperimentale antitumorale. [40] [41]

L'importanza degli studi di Eichler e Penno risiede anche in un risvolto pratico: la scoperta che elevati livelli di DSBs sono associati alla patologia fornisce un biomarcatore plasmatico (aumentati livelli di 1-deoxySLs plasmatici) e bioptico (elevati livelli di 1-deoxySLs alla biopsia di cute) che possono essere utilizzati, insieme alla storia clinica e ad altre valutazioni, per rinforzare o indebolire l'ipotesi diagnostica di HSAN-IA, prima del riscontro delle mutazioni specifiche all'analisi genetica.

Un ulteriore risvolto pratico, questa volta in campo terapeutico, è stato introdotto in letteratura da Vera Fridman nel 2019. La ricercatrice ha infatti pubblicato i risultati di un trial terapeutico basato sulla supplementazione di L-serina in pazienti HSAN-I; in questo studio ha usato i livelli plasmatici di 1-deossisfingolipidi come una delle misure di outcome nella valutazione dell'efficacia del trattamento [42].

Bode et al. nel 2016 hanno dimostrato che le mutazioni di HSAN-I in SPT hanno proprietà biochimiche distinte, che possono consentire la previsione dei sintomi clinici sulla base del profilo delle basi sfingoidi plasmatiche (profilo lipidomico).

Al contrario di alcuni studi precedenti che avevano segnalato una ridotta attività in vitro di SPT mutante [36] [38], in questo studio è stato messo in evidenza come nessuna delle mutazioni a carico di SPTLC1 abbia mostrato una riduzione dell'attività enzimatica. Bode e il suo gruppo di ricerca hanno messo in evidenza che due mutazioni, p.C133Y e p.C133W, sono associate ad aumentati livelli di 1-deossisfingolipidi e ad attività canonica di SPT inalterata, mentre altre due mutazioni, p.S331F e p.S331Y, si caratterizzano per un'aumentata attività canonica del complesso enzimatico SPT con un conseguente aumento della sintesi, e quindi dei livelli plasmatici, di peculiari sfingolipidi canonici, gli sfingolipidi a base sfingoide C20 (sfinganina e ceramide), riconosciuti come segno distintivo di queste due mutazioni, associate a fenotipo severo ad insorgenza precoce.

Oltre al palmitoil-CoA, SPT infatti può anche utilizzare altri acil-CoA nell'intervallo C14-C18, per formare basi sfingoidi con catene di carbonio di varia lunghezza. Le basi sfingoidi C20, in particolare, sono formate dalla coniugazione di stearil-CoA e L-serina [29].

Bode et al. hanno infine analizzato la struttura proteica del complesso enzimatico SPT cercando di correlare quanto riscontrato a livello biochimico e clinico anche a livello della struttura cristallina della proteina: hanno collocato le mutazioni associate alla forma lieve attorno al sito attivo dell'enzima mentre le mutazioni associate alla forma precoce e grave sulla superficie del complesso enzimatico [29].

Degna di nota è la dimostrazione, in un lavoro pubblicato da Zhao et al. nel 2015, che nel modello animale con mutazione spontanea (“stellar mouse”) determinante aumento dell’attività del complesso enzimatico SPT, la sovrapproduzione di questi sfingolipidi a base sfingoide C20 si traduce in una grave neurodegenerazione [43].

Un più recente lavoro riguardo la struttura cristallina del complesso SPT, pubblicato da Wang et al. a marzo 2021 [44], ha fornito importanti spunti di speculazione per la comprensione della patogenesi di HSAN-1A in riferimento a particolari mutazioni del gene SPTLC1.

In questo studio viene esaminata in particolare la componente regolatoria del complesso enzimatico. Oltre le già citate isoforme della subunità ssSPT, viene presa in esame la subunità regolatoria ORMDL3. Questa utilizza il suo terminale aminico (-N) per controllare, in senso negativo, l’accessibilità del sito catalitico dell’enzima al substrato enzimatico. È stato messo in evidenza che alcune specifiche mutazioni del gene SPTLC1 - in particolare le mutazioni p.S331F, p.S331Y per quanto riguarda la HSAN-IA – (ma anche la mutazione del gene SPTLC2 p.I504F per quanto riguarda la HSAN-IC), si trovano a livello dell’interfaccia tra la subunità catalitica SPTLC1 e la subunità regolatoria ORMDL3 della proteina enzimatica, e hanno quindi un ruolo fondamentale nella composizione strutturale e nell’interazione delle due subunità (vedi **Figura 5**).

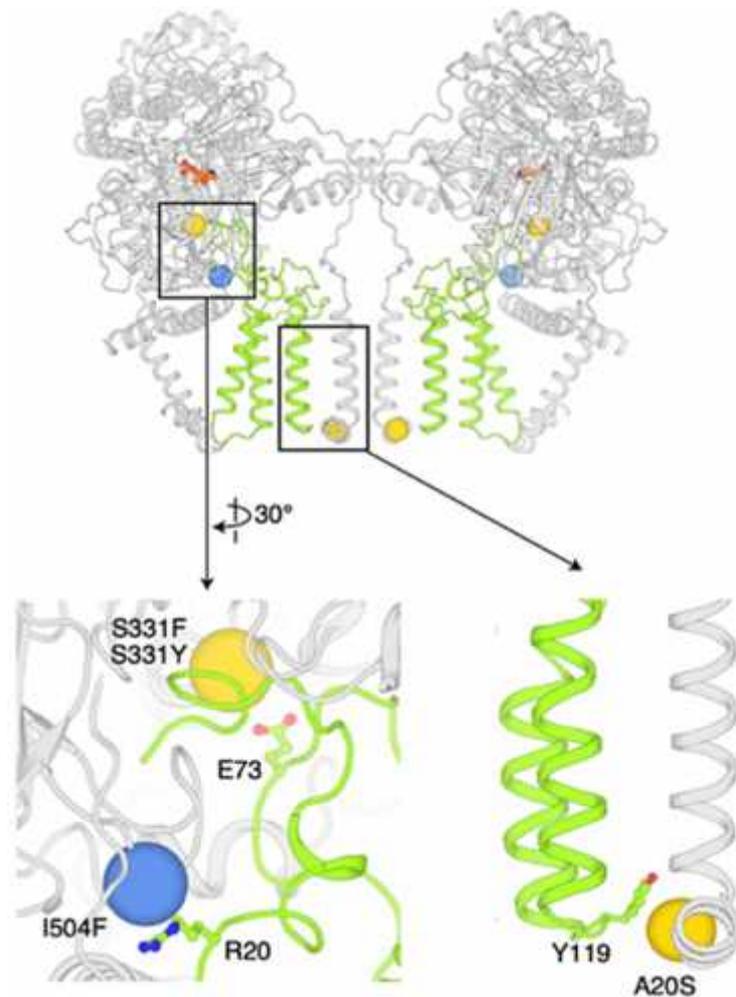


Figura 5 Localizzazione all'interno della struttura cristallina del complesso enzimatico SPT delle mutazioni S331F e S331Y [44]

È pertanto probabile che queste mutazioni disturbino le interazioni steriche di ORMDL3 compromettendone la funzione regolatoria. In questo caso verrebbe meno la funzione di regolazione dell'accessibilità del sito catalitico ai substrati L-serina e palmitoil-CoA con un aumento dell'attività enzimatica del complesso SPT.

Secondo quanto esposto le mutazioni p.S331F e p.S331Y del gene SPTLC1 - che vedremo essere di centrale importanza nell'ambito di questa tesi - determinerebbero una "gain of function tossica" del complesso enzimatico serina palmitoil-transferasi (**Figura 6**) [44].

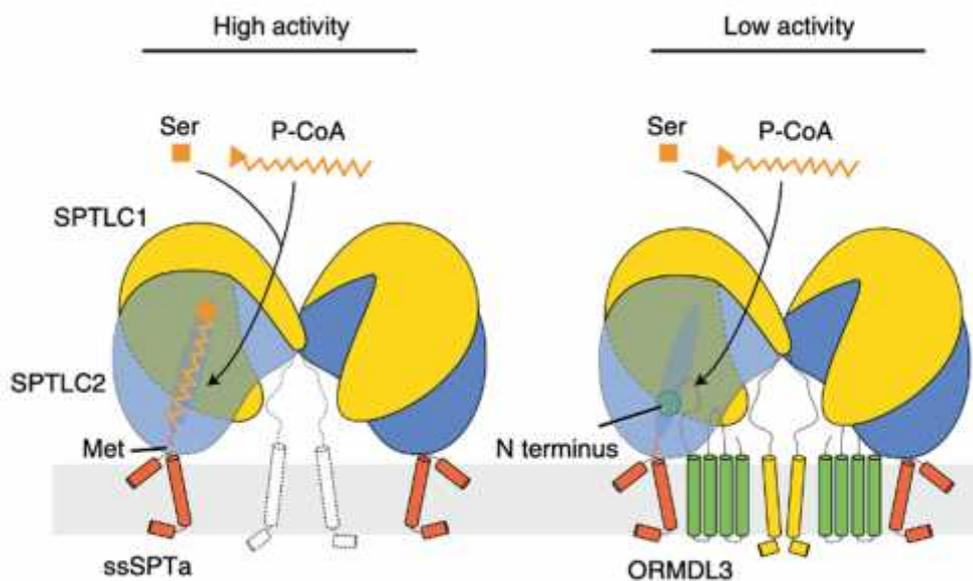


Figura 6 Meccanismo di regolazione del complesso enzimatico SPT [44]

Caratteristiche cliniche

HSAN-IA è caratterizzata da un quadro di deficit neurologico con prevalente coinvolgimento del sistema sensitivo e variabile coinvolgimento del sistema nervoso autonomo e del sistema motorio.

Sistema sensitivo

Il sintomo cardine di coinvolgimento della componente sensitiva è l'ipo-anestesia prevalentemente distale, con possibile progressiva estensione a livello prossimale. Si osserva generalmente la netta prevalenza del coinvolgimento della sensibilità termodolorifica, mentre la sensibilità tattile e le sensibilità profonde sono tipicamente relativamente conservate.

Conseguenti alle alterazioni della sensibilità sono frequenti callosità e ulcere a carattere indolente che si osservano di solito a livello della pianta dei piedi; non è

infrequente che le ulcere, se trascurate, si complicano, con lo sviluppo di processi infettivi che possono rendersi responsabili di osteomieliti, fratture patologiche e mutilazioni distali, nel quadro di quella che viene definita acropatia ulcero-mutilante.

Può far parte del quadro clinico anche un'artropatia neurogena, artropatia secondaria ad alterazione della sensibilità dolorifica e propriocettiva che riduce i riflessi che fisiologicamente proteggono le articolazioni dai traumi. Questa si presenta con lesioni articolari simili a quelle dell'artrosi con la caratteristica mancanza di dolenzia, elemento che contrasta con l'entità dei danni articolari riscontrati all'imaging.

Spesso coesiste con i sintomi sopra citati anche la presenza di dolore neuropatico, solitamente descritto come folgorante/lancinante e gravemente incidente sulla qualità della vita del paziente.

Parte dei sintomi - quali l'ipo-anestesia sensitiva, il dolore neuropatico e la necrosi tissutale - sono giustificati dalla compresenza di una neuropatia delle piccole fibre.

Sistema nervoso autonomo

I disturbi autonomici presenti in pazienti affetti da HSAN-IA sono generalmente modesti. Sono tuttavia descritti possibili alterazioni della sudorazione nelle aree colpite (anidrosi) e della termoregolazione (episodi febbrili ricorrenti), alterazioni del transito gastro-intestinale (reflusso gastroesofageo, eruttazioni, rallentato svuotamento gastrico, vomito, dolori addominali, diarrea), alterazioni della lacrimazione (a-
ipolacrimia con ricorrenti episodi di ulcerazioni corneali).

Sistema motorio

Il coinvolgimento motorio è variabile e generalmente limitato al distretto distale degli arti. Si manifesta prevalentemente con atrofia muscolare (tipicamente peroneale) e ipostenia (> distale) di grado variabile.

Altri segni e sintomi

Nel tempo in letteratura sono stati descritti altri sintomi e segni secondari al coinvolgimento neurologico o comunque che si possono associare al quadro clinico di base, quali: deformità scheletriche (scoliosi, pes cavus), riflessi profondi usualmente ridotti o assenti, anomalie oculari (cataratta precoce, teleangectasia maculare di tipo 2 [45]), fascicolazioni linguali, paralisi delle corde vocali, difficoltà respiratorie con eventuale necessità di supporto ventilatorio, sordità neurosensoriale (segnalata in 1 famiglia inglese [7]).

In alcuni case report pediatrici sono stati segnalati anche possibile ritardo nella crescita [17] [18] [20] e ritardo mentale [17].

Sindrome S331

Come è stato anticipato nel paragrafo riguardo la genetica, in letteratura si segnalano le mutazioni in S331 per il precoce onset di malattia e il fenotipo particolarmente severo, caratterizzato da prevalente interessamento motorio e sensitivo precoce, possibile coinvolgimento dei nervi cranici – senza compromissione della deglutizione – e del nervo frenico, prominente ipo/atrofia muscolare, anomalie oculari e scheletriche (scoliosi e pes cavus), ritardo nella crescita e ritardo mentale.

Il primo studio pubblicato in letteratura che ha portato all'attenzione della ricerca un paziente pediatrico con fenotipo severo risale al 2009: Rotthier et al. hanno descritto un paziente gipsy francese affetto da mutazione p.S331F con malattia congenita caratterizzata da un quadro clinico molto complesso, che ha permesso di ampliare lo spettro clinico di HSAN-IA. [17]

Negli anni successivi sono stati pubblicati lavori riguardo altri pazienti pediatrici con quadri clinici simili associati a mutazioni del codone S331. [18] [19] [20]

Vista la peculiare età d'insorgenza della malattia in questi pazienti e la particolare severità del quadro clinico associate a mutazione a carico di questo specifico codone, in letteratura si inizia a parlare di "S331 syndrome". [18] [20]

Esami paraclinici

Elettroencefalografia (ENG)

Dal punto di vista neurofisiologico, HSAN-IA è stata descritta come una neuropatia periferica prevalentemente assonale sensitiva. Nella maggior parte dei pazienti si evidenziano anche segni di una neuropatia motoria variabile. In particolare l'ENG mette in evidenza una tipica riduzione dell'ampiezza, fino all'assenza, dei potenziali sensitivi - in particolare a livello del nervo surale - con frequente riduzione dell'ampiezza del CMAP.

Le velocità di conduzione non sempre presentano franche alterazioni, segno di esplicita componente demielinizzante. Spesso, tuttavia, si possono riscontrare riduzioni delle velocità di conduzione suggestive di una componente demielinizzante benché questo riscontro potrebbe essere anche spiegato dalla perdita di grandi assoni

o dalla presenza di un numero significativo di fibre in via di rigenerazione scarsamente mielinizzate [46].

Oggi si parla di HSAN-IA come di una neuropatia lunghezza-dipendente sensitiva e motoria mista assonale e demielinizzante.

Caratterizzazione istopatologica

La caratterizzazione istopatologica di HSAN-IA si basa su biopsia di nervo e biopsia di cute.

- Biopsia di nervo

L'articolo di Houlden pubblicato su Brain nel 2006 [46] è il principale riferimento in letteratura per quanto riguarda la biopsia di nervo in pazienti HSAN-IA dal momento che questo tipo di indagine, invasiva, non si fa di routine né a fini diagnostici né ai fini della ricerca.

In questo studio è stata eseguita la biopsia di nervo surale in 6 pazienti adulti appartenenti a 4 diverse famiglie, tutte affette dalla stessa mutazione di SPTLC1 (p.C133W). Tale studio ha evidenziato:

- grave e prevalente perdita di fibre mieliniche (**Figura 7**)
- maggiore conservazione delle fibre amieliniche (**Figura 8**)
- scarsissima evidenza di attività rigenerativa
- in due pazienti (Famiglia 6, II-11 e Famiglia 6, II-1) alcune delle fibre mieliniche rimaste evidenziavano internodi sottoposti a processi di demielinizzazione (**Figura 9**)

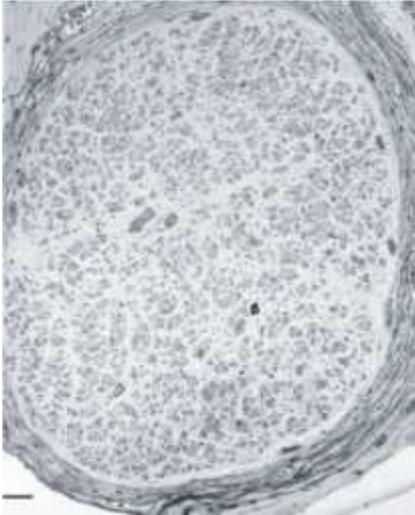


Figura 7

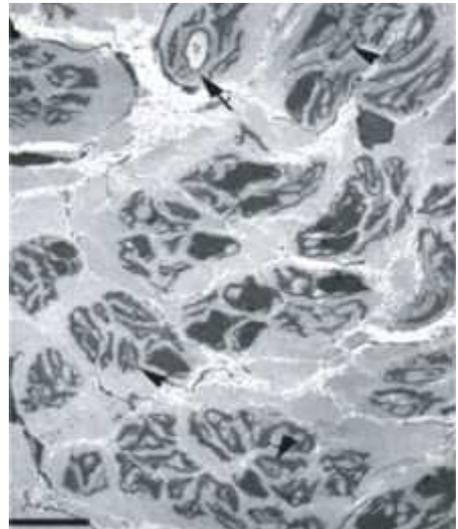


Figura 8

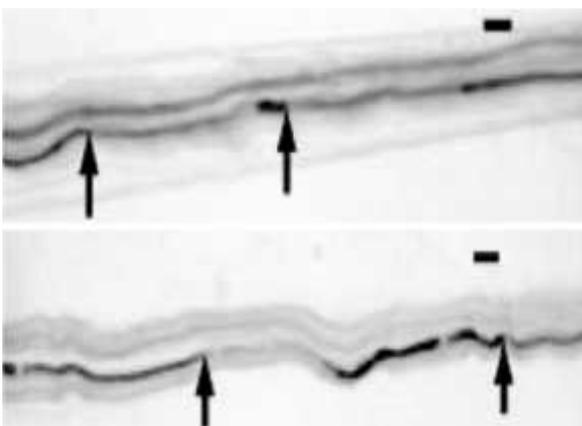


Figura 9

Questi riscontri rappresentano il corrispettivo istologico di quanto riscontrato a livello neurofisiologico.

In uno studio pubblicato nel 2016 da Huehne et al. [16] viene descritta la biopsia di nervo di un paziente HSAN-IA con mutazione SPTLC1 p.S331F. Vengono descritte:

- marcata riduzione della densità delle fibre mieliniche
- segni di danno assonale
- presenza di fibre amieliniche

Il quadro osservato in questo paziente è quindi sostanzialmente sovrapponibile con quanto descritto nei sei pazienti p.C133W da Houlden qualche anno prima.

- Biopsia di cute

Questo esame permette di entrare nel merito della componente di neuropatia delle piccole fibre, caratteristica di HSAN.

In letteratura diversi studi sostengono che la biopsia di cute, eseguita a livello della porzione distale della gamba, sia il migliore strumento per lo studio della densità delle piccole fibre (ENFD: Epidermal Nerve Fiber Density) [Raccomandazione di grado C dell'American Academy of Neurology (AAN) e raccomandazione di grado A dell'European Federation of Neurological Societies] [47] [48].

La biopsia di cute per lo studio dell'ENFD, permette di esplorare una componente di sofferenza neurologica, parte del quadro di HSAN, che non può essere indagata tramite gli studi di conduzione nervosa standard dal momento che questi permettono una buona valutazione elettrofisiologica delle fibre di grosso calibro ma non delle piccole fibre, che non contribuiscono in maniera significativa alla composizione dei potenziali d'azione misurati all'ENG.

Si tratta di una tecnica sensibile e minimamente invasiva e quindi di una potenziale importante risorsa per integrare le conoscenze istopatologiche in pazienti affetti da neuropatia al fianco della biopsia di nervo, tecnica eccessivamente invasiva per un impiego routinario ai fini della ricerca.

Fridman et al. hanno pubblicato nel 2014 il primo studio in letteratura che descrive la densità delle piccole fibre su biopsia di cute in 6 pazienti adulti HSAN-I.

Su ogni paziente sono state condotte sia una biopsia a livello della parte distale del polpaccio, sia una seconda biopsia a livello della coscia con i seguenti riscontri:

- A livello della biopsia distale del polpaccio è stata descritta una completa denervazione epidermica
- A livello della biopsia della coscia, anche in pz con malattia severa, è stata descritta una relativa preservazione dell'innervazione epidermica (**Figura 10**)

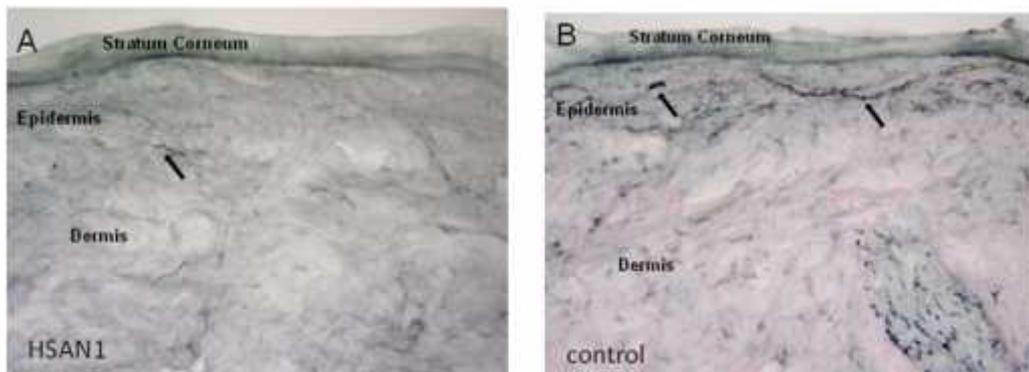


Figura 10: Biopsia di cute della coscia che mostra perdita di fibre nervose intraepidermiche (frecche nere) in un paziente rappresentativo affetto da HSAN-I (A) rispetto a un controllo di pari età (B) che presenta normale distribuzione delle piccole fibre [49]

Fridman ha messo in evidenza che la densità delle piccole fibre mostra una buona correlazione con gli studi di conduzione nervosa e con il punteggio CMTES (CMT Examination Score), concludendo quindi che la valutazione della densità delle piccole fibre alla biopsia cutanea del polpaccio distale può essere una promettente misura di outcome nei trials clinici [49].

Proprio sulla base delle conclusioni di questo studio Fridman et al., hanno usato la densità delle piccole fibre come una delle misure di outcome nel trial sulla supplementazione con L-serina in pz adulti HSAN-I con mutazione di SPTLC1 sintomatici [42], come vedremo nel paragrafo successivo riguardo la terapia.

Dosaggio biochimico degli sfingolipidi

Nonostante non sia un esame diagnostico di routine, il dosaggio sierico degli sfingolipidi è stato utilizzato in letteratura per confermare la patogenicità delle mutazioni a carico del gene SPTLC1. McCampbell et al. [38] sono stati i primi a segnalare un aumento dei livelli plasmatici di due ceramidi a lunga catena (C16:0 e C18:0), precursori della glucosilceramide, precedentemente segnalata come elevata in pazienti affetti da HSAN-I [24]. Penno et al. nel 2010 hanno dimostrato alti livelli di 1-deossi-sfinganina (m18:0) e 1-deossimetil-sfinganina (m17:0), due basi sfingoidi atipiche, nel siero dei pazienti. Hanno quindi suggerito di usare i DBS come marcatori ematici, utili insieme alla clinica e agli altri esami paraclinici, per rinforzare l'ipotesi di HSAN-I.

Bode et al. in uno studio pubblicato nel 2016 hanno dimostrato che due mutazioni specifiche di SPTLC1 (p.S331F e p.S331Y) si caratterizzano, oltre che per l'aumento dei livelli plasmatici degli 1-deossisfingolipidi, anche per aumentati livelli delle basi sfingoidi C20 [29].

Un altro risvolto pratico del dosaggio degli sfingolipidi plasmatici è in campo terapeutico: Vera Fridman e il suo gruppo di ricerca hanno usato il dosaggio degli sfingolipidi plasmatici come una delle misure di outcome del trial basato sulla supplementazione di L-serina in pazienti HSAN-I adulti [42].

Test per la valutazione del sistema nervoso autonomo

Il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo nell'ambito delle polineuropatie è di facile riscontro clinico. Possono tuttavia essere eseguiti dei test per una valutazione standardizzata, più utile ai fini del monitoraggio in ambito di ricerca rispetto al fine diagnostico.

- Risposta simpatico cutanea (sympathetic skin response o SSR)

Un possibile approccio non invasivo per la valutazione del sistema simpatico è la risposta simpatico cutanea, test che indaga, in maniera non invasiva, l'eventuale presenza di una disfunzione del sistema autonomo nella sua componente sudomotoria attraverso la risposta simpatico cutanea a un'alterazione evocata temporanea del potenziale elettrico della cute (vedi Capitolo 3).

Solders et al. in un lavoro pubblicato nel 1991 che si è occupato di studiare la conduzione nervosa centrale e la funzione del SNA in pazienti affetti da HSAN-I, hanno effettuato lo studio della risposta simpatico cutanea su 15 pazienti. Oltre al riscontro di

aumento della latenza e diminuzione dell'ampiezza della risposta caratteristiche di tutti i pazienti, hanno segnalato l'assenza di risposta in 5 dei 15 pazienti analizzati [50]. Questi dati mettono in evidenza la presenza di una disfunzione del SNA in pazienti HSAN-IA.

- COMPASS331

Un ulteriore strumento per la valutazione del coinvolgimento del SNA sono questionari da somministrare ai pazienti che permettono di raccogliere informazioni anamnestiche riguardo i sintomi disautonomici. Uno di questi è il COMPASS331 (vedi Capitolo 3) [51].

Terapia

Il sempre maggiore grado di conoscenza delle basi patogenetiche di HSAN-I ha permesso di ideare una possibile terapia con razionale biologico.

Nel capitolo riguardo la patogenesi abbiamo visto che la presenza di forme mutate della subunità SPTLC1 dell'enzima SPT porta a un cambio della specificità di affinità al substrato enzimatico. Il substrato canonico L-serina viene sostituito dai substrati atipici L-alanina e glicina con la conseguente formazione di deossisfingolipidi neurotossici.

L'idea era quella di fornire una supplementazione orale di alte dosi di L-serina, nell'ottica di intervenire in qualche modo nella via metabolica alterata di formazione degli sfingolipidi, forti delle precedenti esperienze di integrazione dell'amminoacido nell'ambito del trattamento di disturbi da carenza di serina secondari a deficit di biosintesi della stessa [52].

Garofalo et al. nel 2011 hanno esaminato i risultati della supplementazione dietetica di L-serina in topi transgenici SPTLC1(C133W) e successivamente i risultati di uno studio pilota svolto su 14 pazienti affetti da HSAN-I.

L'integrazione con L-serina nei topi ha portato a una riduzione significativa dei livelli plasmatici di 1-deossisfingolipidi nonché ad un miglioramento clinico sia nelle prestazioni motorie sia in quelle sensitive.

Lo studio pilota condotto sull'uomo ha dimostrato, analogamente a quanto riscontrato nel modello animale, la riduzione dei livelli plasmatici degli sfingolipidi neurotossici [53].

Questi risultati hanno consolidato l'idea che l'integrazione con L-serina potesse essere una valida opzione di trattamento o comunque di arresto della progressione di HSAN-I.

Queste esperienze avevano inoltre evidenziato alcuni possibili effetti collaterali reversibili legati alla somministrazione orale di L-serina fino a una dose massima di 400mg/kg/die (dose corrispondente alla massima somministrata ai pazienti dei trials) quali nausea, vomito, nistagmo e mioclono [52].

Fridman et al. [42] nel 2019 hanno pubblicato i risultati di un trial randomizzato contro placebo della durata di due anni che si è occupato di valutare la sicurezza e l'efficacia del trattamento tramite supplementazione orale con alte dosi di L-serina in pazienti adulti affetti da HSAN-I.

Il trial è stato condotto su 16 pazienti clinicamente sintomatici con età compresa tra i 18 e i 70 anni e diagnosi di HSAN-IA confermata dal riscontro genetico della mutazione di SPTLC1.

Nella prima parte del trial, della durata di un anno, metà dei pazienti sono stati randomizzati al gruppo a cui è stata somministrata L-serina ad alte dosi (400 mg/kg/d) in tre dosi giornaliere e l'altra metà al gruppo a cui è stato somministrato il placebo. Nella seconda parte dello studio, anche questa della durata di un anno, tutti i pazienti sono stati trattati con L-serina.

La misura di outcome primaria era il punteggio alla scala CMTNS (Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score version 2). Le misure di outcome secondarie erano i livelli plasmatici di sfingolipidi e amminoacidi, la densità delle piccole fibre alla biopsia di cute, esiti dei test elettrofisiologici, dei test di funzionalità del sistema autonomico (AFT: autonomic function tests) e dei questionari SF-36 e (36-item Short Form health questionnaire) NPS (Neuropathy Pain Scale) somministrati ai pazienti stessi e infine la segnalazione di eventuali effetti avversi.

I pazienti sono stati valutati al baseline e in 4 visite di follow-up condotte a 24, 48, 72 e 96 settimane dal baseline.

Già dopo un anno di trattamento nei pazienti randomizzati a L-serina si è evidenziato:

- miglioramento del punteggio alla scala CMT neuropathy score, con evidenza di continuo miglioramento durante il secondo anno di trattamento;
- riduzione del 59% dei livelli di 1-deossisfingolipidi sierici;

- alla biopsia di cute per lo studio delle piccole fibre, dopo un anno sono stati riscontrati segni di reinnervazione a livello della porzione distale del polpaccio e nessuna evidenza di miglioramento a livello della coscia.

Non è stato riscontrato nessun significativo beneficio nelle valutazioni elettrofisiologiche, in quelle del sistema nervoso autonomo (AFT) - probabilmente a causa della scarsità dei sintomi riscontrati al baseline -, nei questionari NPS e SF-36.

Non sono stati registrati significativi eventi avversi; i più comuni tra i segnalati sono stati dolore addominale, dispepsia e infezioni.

Questo studio ha quindi dimostrato che il trattamento con L-serina è ben tollerato e produce significativi risultati biochimici e alcuni, seppur non brillanti, risultati clinici in pazienti adulti.

Tuttavia la maggior parte dei pazienti del trial soffrivano già di una forma avanzata di neuropatia per cui è stato ipotizzato che lo stesso trattamento somministrato in fasi più precoci possa dare effetti maggiormente soddisfacenti.

Gli stessi autori suggeriscono l'importanza di iniziare il trattamento in età pediatrica subito dopo la diagnosi, in modo tale da cercare di ritardare il più possibile l'insorgenza dei sintomi o comunque la progressione di questi.

Sulla base di queste considerazioni abbiamo intrapreso il tentativo di supplementazione con L-serina in due pazienti pediatriche affette da HSAN-IA seguite presso l'UOC Neurologia e Malattie muscolari dell'Istituto Giannina Gaslini.

Capitolo 2: Obiettivi della tesi

- Caratterizzazione clinica, biochimica, neurofisiologica ed istopatologica di due pazienti affette da HSAN-IA, portatrici di mutazioni a carico del codone S331 in cura presso l'UOC Neurologia e Malattie muscolari dell'Istituto Giannina Gaslini.
- Confronto con gli altri casi pediatrici portatori di mutazioni a carico di S331 segnalati in letteratura nell'ottica di fornire ulteriori elementi a supporto della nascente "sindrome S331".
- Avvio del trial terapeutico con supplementazione di L-serina e valutazioni iniziali riguardo l'efficacia in questo piccolo gruppo di pazienti.

Capitolo 3: Materiali e metodi

PAZIENTI

Questa tesi si focalizza su due pazienti pediatriche affette da HSAN-IA, selezionate tra i circa 60 pazienti affetti da neuropatia in cura presso l'UOC Neurologia Pediatrica e Malattie Muscolari dell'Istituto Giannina Gaslini.

La paziente 1 è una bambina di 14 anni, portatrice della mutazione de novo p.S331Y. Tale mutazione è stata riportata in letteratura in soli altri due casi pediatrici, caratterizzati da fenotipo grave ad esordio precoce associato a cataratta, bassa statura e problemi respiratori. La nostra paziente ha avuto un esordio precoce di malattia con parestesie dolorose ed ipostenia distale degli arti inferiori. Attualmente non è deambulante e necessita di supporto ventilatorio notturno.

La paziente 2 è una bambina di 6 anni, portatrice della mutazione de novo p.S331F. Tale mutazione è stata descritta in letteratura in tre pazienti pediatrici con quadro variabile ma tendenzialmente severo. Il fenotipo della nostra paziente è caratterizzato da esordio molto precoce. Attualmente la bambina è in grado di deambulare autonomamente pur manifestando impaccio motorio e frequenti cadute. Presenta inoltre opacità del cristallino, ipoestesia termodolorifica e moderati disturbi disautonomici.

ANALISI GENETICHE

Il DNA genomico estratto dai leucociti delle pazienti è stato analizzato mediante sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing) su Ion Gene Studio 55TM – IonTorrent. Il pannello include gli esoni e le regioni fiancheggianti di 56 geni associati a neuropatie ereditarie: AARS, ATP7A, BICD2, DCTN1, DHTKD1, DNAJB2, DNM2, DYNC1H1, EGR2, FBLN5, FBX038, FGD4, FIG4, GARS, GDAP1, GJB1, GNB4, HARS, HINT1, HK1, HSPB1, HSPB3, HSPB8, IGHMBP2, INF2, KARS, LITAF, LMNA, LRSAM1, MARS, MED25, MFN2, MPZ, MTMR2, NDRG1, NEFL, PDK3, PLEKHG5, PMP22, POLG, PRPS1, PRX, RAB7A, REEP1, SBF1, SBF2, SETX, SH3TC2, SLC5A7, SPTLC1, SPTLC2, SURF1, TRIM2, TRPV4, TTR, YARS.

Le varianti identificate sono state confermate mediante sequenziamento con metodo Sanger.

SCALA CMT PEDIATRICA (CMTPedS)

Si tratta di una scala multi-item validata per la quantificazione standardizzata del grado di disabilità in pazienti pediatrici (> 3 anni), affetti da malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT). La scala valuta 11 items che esplorano 7 ambiti (forza, destrezza manuale, sensibilità, andatura, equilibrio, potenza, resistenza). Si completa in circa 25 minuti con la generazione di un punteggio da 0 a 44 punti, misura affidabile di disabilità [54].

Abbiamo usato la scala CMT pediatrica per la quantificazione standardizzata della compromissione motoria e sensitiva delle due pazienti.

In mancanza di una specifica scala validata per la valutazione dei pazienti pediatrici affetti da HSAN-IA, il rationale alla base dell'utilizzo della CMTPedS è il paragonabile

quadro di coinvolgimento sensitivo e motorio caratteristico delle due neuropatie e l'utilizzo del CMTNS - versione della scala usata per la valutazione di pazienti adulti - per la valutazione clinica standardizzata nel trial di supplementazione condotto da Fridman et al. [42].

cmtpediatricscale
Initial Evaluation Re-Evaluation Date:

Patient Profile											
ID:			D.O.B:			Age (yrs):			Gender: Boy <input type="checkbox"/> Girl <input type="checkbox"/>		
Height (m):		Weight (kg):		Dominant Hand: L <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/>		Dominant Foot: L <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/>		Diagnosis:			
Symptoms:	Foot pain <input type="checkbox"/>		Leg cramps <input type="checkbox"/>		Unsteady ankles <input type="checkbox"/>		Daily trips and/or falls <input type="checkbox"/>		Hand pain <input type="checkbox"/>		
	Hand weakness <input type="checkbox"/>		Hand tremor <input type="checkbox"/>		Sensory symptoms (e.g. pins and needles, tingling, numbness, prickling) <input type="checkbox"/>						
Lunge test (degrees)						Left:			Right:		
Foot Posture Index:	Talar head palpation										
	Curves above and below lateral malleolus										
	Inversion/eversion of the calcaneus										
	Bulge in the region of the talonavicular joint										
	Congruence of the medial longitudinal arch										
	Abd/adduction of forefoot on rearfoot (too-many-toes)										
Total (-12 to 12)											
Hand Dexterity											
1. Functional Dexterity Test (sec)						2. Nine-hole peg test (sec)					
Strength			Trial 1		Trial 2		Trial 3		Average		
3. Hand grip (N)									[2]		
4. Foot plantarflexion (N)											
5. Foot dorsiflexion (N)											
Sensation	0	1	2	3	4	Score					
						6. Pinprick	Normal	Decreased below or at ankle bones	Decreased at or below midline of calf	Decreased above calf midline up to and including knee	Decreased above knee (above top of patella)
7. Vibration	Normal	Reduced at first metatarsal bone	Reduced at ankle	Reduced at knee (tibial tuberosity)	Absent at knee and ankle						
Balance											
Assistive device required (e.g. AFO) Y/N. Describe device and footwear:											
8. Bruininks Oseretsky Test	Raw Score		Conduct second trial only if examinee does not earn the maximum score on the first trial							Point score	
	Trial 1	Trial 2	Raw	0.0-0.9	1.0-2.9	3.0-5.9	6.0-9.9	10			
Standing with feet apart on a line-eyes open			Raw	0	1	2	3	4			
Walking forward on a line			Raw	0	1-2	3-4	5	6			
Standing on one leg on a line-eyes open			Raw	0.0-0.9	1.0-2.9	3.0-5.9	6.0-9.9	10			
Standing with feet apart on a line-eyes closed			Raw	0	1	2	3	4			
Walking forward heel-to-toe on a line			Raw	0	1-2	3-4	5	6			
Standing on one leg on a line-eyes closed			Raw	0.0-0.9	1.0-2.9	3.0-5.9	6.0-9.9	10			
Standing on one leg on a beam-eyes open			Raw	0	1	2	3	4			
Standing heel-to-toe on a balance beam			Raw	0.0-0.9	1.0-2.9	3.0-5.9	6.0-9.9	10			
Standing on one leg on a beam-eyes closed			Raw	0	1	2	3	4			
			Raw	0.0-0.9	1.0-2.9	3.0-4.9	5.0-7.9	8.0-9.9	10		
			Point	0	1	2	3	4	5		
										Total	
Motor Function											
Assistive device required (e.g. AFO) Y/N. Describe device and footwear:											
9. Gait	Foot drop: No <input type="checkbox"/> Some <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/>		Difficulty heel walking: No <input type="checkbox"/> Some <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/>		Difficulty toe walking: No <input type="checkbox"/> Some <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/>						
10. Long jump (cm)			11. Six-minute walk test (m)								
Item Scores (0-4)											Total Score (0-44)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	

Revised Subscale from the Bruininks Oseretsky Test of Motor Proficiency, Second Edition (BOT-2). Copyright © 2007 Pearson, Inc. Adapted and reproduced with permission. All rights reserved.

Figura 11 Scheda usata per la valutazione [54]

Per la compilazione di tale scheda è necessario inserire i dati anagrafici del paziente (nome e cognome, data di nascita, età, sesso), peso, altezza, mano e piede dominanti, diagnosi e sintomi lamentati.

Si passa poi alla valutazione della morfologia dei piedi mediante il **Foot Posture Index (FPI)** considerando 6 criteri:

- palpazione della testa dell'astragalo
- curve sopra e sotto il malleolo laterale
- inversione/eversione del calcagno
- rigonfiamento nella regione dell'articolazione astragalo-navicolare
- congruenza dell'arco longitudinale mediale
- abduzione/adduzione dell'avampiede sul retro piede

Per entrambi i piedi, ad ogni voce di questo elenco, bisogna assegnare un punteggio da +2 a -2, dove 0 corrisponde a una posizione neutra del piede, -2 a chiari segni di supinazione e +2 a chiari segni di pronazione. Il punteggio totale per ogni piede varia da -12 (piede estremamente supinato/pes cavus) a +12 (piede estremamente pronato/pes planus).

Si passa infine alla valutazione degli undici items:

1. Functional dexterity test (FDT)

È una misura della destrezza manuale per esplorare la capacità del paziente di svolgere attività quotidiane che richiedono prensioni a tre dita (es. abbottonarsi, allacciarsi le scarpe, avvitare). La prova consiste nel girare di 180°, uno alla volta, 16 pioli, inseriti in un pannello forato, per infilarli poi nuovamente nei buchi, con la mano dominante.

L'esercizio viene cronometrato (in secondi) e termina quando l'ultimo piolo viene riinserto nel contenitore.



Figura 12 Functional dexterity test

2. Nine hole peg test

Viene utilizzato per esaminare la capacità motoria, la destrezza e la coordinazione occhio-mano. La prova consiste nell'infilare uno alla volta 9 pioli sottili nei buchi di un pannello forato e poi rimuoverli nuovamente uno per uno con la mano dominante. L'esercizio viene cronometrato (in secondi).



Figura 13 Nine hole peg test

3. Grip strength

La forza di presa della mano viene quantificata utilizzando un dinamometro portatile. Vengono eseguite e registrate tre prove di 3-5 secondi, viene fatta la media dei tre punteggi e poi viene moltiplicata per due.

4. Forza di flessione plantare

5. Forza di dorsiflessione

Queste due componenti vengono quantificate a livello del piede dominante utilizzando il dinamometro posto, appena prossimalmente alla parte distale del metatarso, contro la superficie plantare del piede per la valutazione della forza di flessione plantare mentre contro la superficie dorsale del piede per la valutazione della forza di dorsiflessione. Vengono eseguite 3 prove di flessione plantare e 3 prove di dorsiflessione, ognuna della durata di 3-5 secondi. Viene poi fatta la media tra le tre registrazioni.



Figura 14 Prova di forza di flessione plantare



Figura 15 Prova di forza di dorsiflessione plantare

6. Pinprick

Si tratta della prima parte della valutazione della sensibilità e esplora la sensibilità dolorifica. Il test consiste nel pungere il paziente con uno spillo chiedendo un feedback se sente la puntura. Prima di tutto bisogna determinare se il bambino è in grado di discriminare tra il lato smusso e quello appuntito dello spillo, poi si testa una regione corporea con sensibilità attesa normale (di solito la coscia distale, sopra la rotula). Se non avverte la puntura a questo livello, si assegna un punteggio di 4 e si passa al test successivo. Se avverte la puntura, il test viene eseguito a livello della gamba, in

direzione disto-proximale, e graduato secondo i 4 livelli indicati di seguito dalla CMT Neuropathy Score (CMTNS-2nd, 2010) (**Figura 16**):

- 0 → sensibilità normale
- 1 → alterazione della sensibilità al di sotto di una linea che passa attraverso i malleoli
- 2 → alterazione della sensibilità al di sotto della linea mediana della gamba
- 3 → alterazione della sensibilità al di sopra della linea mediana della gamba fino al ginocchio compreso (parte superiore della rotula)
- 4 → alterazione della sensibilità al di sopra della rotula

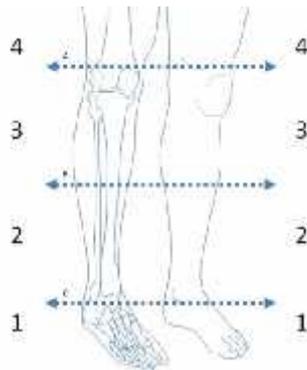


Figura 16

7. Vibrazione

Si tratta della seconda parte della valutazione della sensibilità: si testa la sensibilità vibratoria (pallestesia). Il test consiste nel determinare se il bambino è in grado di sentire il diapason vibrare quando appoggiato su una prominenza ossea.

Prima si testa un'area con sensibilità vibratoria attesa normale (es. clavicola) poi si inizia il test. Si mette in moto il diapason e quando i rebbi iniziano a oscillare, si appoggia in punti codificati dell'arto inferiore. Al bambino viene chiesto di segnalare quando smette di avvertire lo stimolo.

Se il bambino non sente alcuna vibrazione bisogna assegnare un punteggio di 4 e si passa al test successivo. Se il bambino avverte gli stimoli, il test viene eseguito a livello degli arti inferiori in senso disto-proximale e si valuta in base ai 4 livelli descritti di seguito dal CMT Neuropathy Score (CMTNS-2 nd, 2010):

- 0 → normale
- 1 → alterazione della sensibilità a livello del primo osso metatarsale
- 2 → alterazione della sensibilità a livello della caviglia
- 3 → alterazione della sensibilità a livello del ginocchio (tuberosità tibiale)
- 4 → assenza a livello di ginocchio e caviglia

8. Equilibrio

Per la valutazione dell'equilibrio si usa il Bruininks-Oseretsky Test of Motor Proficiency, Second Edition (BOT-2), un test che utilizza diverse attività per misurare un'ampia gamma di abilità motorie in soggetti di età <21 anni. Nel CMTPedS si usa il BOT-2 per l'equilibrio e in particolare si valuta:

- stare in piedi con i piedi divaricati su una linea ad occhi aperti e poi a occhi chiusi;
- camminare in avanti su una linea;
- stare in piedi su una gamba sola su una linea ad occhi aperti e poi a occhi chiusi;
- camminare in avanti su una linea con camminata tallone-punta;
- stare in piedi su una gamba sola su una trave di equilibrio ad occhi aperti e poi a occhi chiusi;
- stare in piedi in posizione tallone-punta su una trave di equilibrio;

I test devono essere eseguiti a piedi nudi e senza devices di assistenza; se questi sono necessari, devono essere documentati e usati anche nelle valutazioni di follow-up. Si cronometra per quanti secondi il paziente riesce a eseguire il compito in maniera corretta e poi si convertono i secondi totalizzati in un punteggio

9. Passo

Si valuta e segnala:

- caduta del piede (segno di debolezza della dorsiflessione durante l'andatura)→ presente, in parte presente, assente
- difficoltà a camminare sui talloni (indicatore grossolano di debolezza della dorsiflessione e dell'accorciamento del tendine di Achille)→ presente, presente in parte, assente
- Difficoltà a camminare sulle punte (indicatore grossolano di debolezza della flessione plantare)→ presente, in parte presente, assente

10. Salto in lungo

Il salto in lungo nel bambino è una misura affidabile della potenza e della coordinazione. Si chiede al bambino di fare un salto più lungo possibile e si misura la distanza in centimetri che è riuscito a coprire con il salto.

11. Six-minute walk test (6MWT)

Permette la valutazione della capacità di resistenza funzionale submassimale.

La prova consiste nel camminare per il maggior numero di giri possibile in 6 minuti (senza correre) lungo un corridoio tranquillo. Agli estremi del percorso vengono posizionati dei coni, che segnano il punto in cui il bambino deve invertire la marcia girandoci intorno. Alla fine dei 6 minuti bisogna calcolare la distanza totale percorsa.

Se il paziente non è in grado di svolgere qualcuno degli items a causa della gravità della patologia, si assegna allo stesso il punteggio correlato al maggior grado di severità.

Per calcolare il punteggio totale si utilizzano dei programmi online in grado di convertire gli scores dei singoli items nello score corretto e di restituire infine lo score totale.

Il range di punteggio ottenibile va da 0 (sano) a 44 punti (paziente gravemente compromesso).

ALTRE VALUTAZIONI PER LO STUDIO DEL COINVOLGIMENTO DELLA COMPONENTE SENSITIVA

Valutazione sensibilità termica

Per la valutazione della sensibilità al freddo e al caldo abbiamo utilizzato due provette Falcon da 50 ml di plastica, asciutte, contenenti rispettivamente acqua congelata e acqua calda (circa 50°C). Abbiamo poi alternativamente appoggiato il fondo delle due provette in diversi punti del corpo delle pazienti facendo attenzione ad esplorare tutta la superficie cutanea, invitandole a rispondere “caldo” o “freddo” a seconda della sensazione avvertita.

Scala di Norfolk

Si tratta di un questionario usato per la valutazione della qualità della vita in pazienti che lamentano sintomi che riguardano la sfera sensitiva, validata nel 2005 nell'ambito della neuropatia diabetica [55]. La versione italiana che abbiamo usato per la valutazione delle due pazienti è costituita da due parti:

- Parte I: sintomi → viene chiesto al paziente se nelle 4 settimane precedenti ha avuto i sintomi elencati in **figura 17** riferiti alla funzione delle fibre nervose di piccolo calibro (es. intorpidimento, formicolio) e grosso calibro (es. sensazione di scossa elettrica, debolezza). Per ogni sintomo si assegna un punteggio da 0 (no, non ho avuto questo sintomo) a 4 a seconda del numero di siti corporei colpiti (piedi, gambe, mani e braccia);
- Parte II: attività quotidiane → attraverso diverse domande si indaga quanto i sintomi neurologici e in generale lo stato di salute hanno limitato il paziente nello svolgimento delle attività di vita quotidiana. Per ogni voce si assegna un punteggio da 0 (nessuna limitazione) a 4 (grave limitazione).

Si sommano poi i punteggi e si ottiene uno score totale, al massimo di 140 punti che corrisponde alla condizione più grave identificabile.

SCALA DI NORFOLK

Updated QOL-DN
Page 2 of 4

Parte I: Sintomi

Ha avuto qualcuno dei seguenti sintomi nelle ultime 4 settimane? La preghiamo di fare una crocetta su tutti i sintomi che ha avuto.

	Piedi	Gambe	Mani	Braccia	No, non ho avuto questo sintomo
1. Intorpidimento.....	<input type="checkbox"/>				
2. Pizzicore, formicolii.....	<input type="checkbox"/>				
3. Sensazione di scossa elettrica.....	<input type="checkbox"/>				
4. Altre sensazioni insolite.....	<input type="checkbox"/>				
5. Dolore in superficie.....	<input type="checkbox"/>				
6. Dolore in profondità.....	<input type="checkbox"/>				
7. Debolezza.....	<input type="checkbox"/>				

Parte II: Attività quotidiane

	Non è stato un problema	Problema molto lieve	Problema lieve	Problema di media entità	Problema grave
Risponda alle domande utilizzando la seguente scala:	0	1	2	3	4
8. Nelle ultime 4 settimane, a causa del dolore è rimasto/a sveglio/a o si è svegliato/a durante la notte?	<input type="checkbox"/>				
9. Nelle ultime 4 settimane, le ha dato fastidio il contatto con le lenzuola, gli indumenti o indossare le scarpe?.....	<input type="checkbox"/>				
10. Nelle ultime 4 settimane, le è capitato di bruciarsi o ferirsi senza sentire alcun dolore?	<input type="checkbox"/>				
11. Nelle ultime 4 settimane, qualche sintomo le ha impedito di svolgere le sue abituali attività durante il giorno?	<input type="checkbox"/>				
12. Nelle ultime 4 settimane, ha avuto difficoltà nel fare piccoli movimenti con le dita, come abbottonarsi i vestiti, girare le pagine di un libro, prendere con le dita delle monete dal tavolo?	<input type="checkbox"/>				
13. Nelle ultime 4 settimane, si è sentito/a malfermo/a sulle gambe quando camminava?	<input type="checkbox"/>				
14. Nelle ultime 4 settimane, ha avuto problemi ad alzarsi dalla sedia senza spingersi con le mani?.....	<input type="checkbox"/>				
15. Nelle ultime 4 settimane, ha avuto problemi a scendere le scale?.....	<input type="checkbox"/>				
16. Nelle ultime 4 settimane, non è stato/a capace di sentire i piedi quando camminava?	<input type="checkbox"/>				
17. Nelle ultime 4 settimane, non è stato/a capace di distinguere l'acqua calda da quella fredda <u>con le mani</u> ?	<input type="checkbox"/>				
18. Nelle ultime 4 settimane, non è stato/a capace di distinguere l'acqua calda da quella fredda <u>con i piedi</u> ?	<input type="checkbox"/>				
19. Nelle ultime 4 settimane, ha avuto problemi di vomito, in particolare dopo i pasti (ma non a causa dell'influenza o di altre malattie)?.....	<input type="checkbox"/>				

Rispondi alle domande utilizzando la seguente scala:					
	0	1	2	3	4
	Non è stato un problema	Problema molto lieve	Problema lieve	Problema di media entità	Problema grave
20. Nelle ultime 4 settimane, ha avuto problemi di diarrea e/o perdite incontrollate di feci?.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
21. Nelle ultime 4 settimane, ha avuto problemi di svenimento o vertigini quando stava in piedi?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nelle ultime 4 settimane, quanta difficoltà ha avuto nello svolgere le seguenti attività:					
22. Farsi il bagno o la doccia?.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23. Vestirsi?.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24. Camminare?.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
25. Sedersi o alzarsi dal water?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
26. Usare posate, piatti, bicchieri, ecc. per mangiare?.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Per niente	Un po'	Abbastanza	Molto	Moltissimo
	0	1	2	3	4
Rispondi alle domande utilizzando la seguente scala:					
Nelle ultime 4 settimane, ha avuto qualcuno dei seguenti problemi nel suo lavoro o in altre abituali attività quotidiane a causa del suo stato di salute fisica o emotiva?					
27. Ha ridotto il tempo da dedicare al lavoro o ad altre attività?.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
28. Ha fatto meno cose di quanto avrebbe voluto?.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
29. È stato/a limitato/a nel tipo di lavoro o in altre attività che poteva svolgere?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
30. Ha avuto difficoltà nello svolgere il lavoro o altre attività (le costava più fatica del solito)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
31. In generale, direbbe che adesso la sua salute è:					
	<u>Eccellente</u>	<u>Molto buona</u>	<u>Buona</u>	<u>Passabile</u>	<u>Scadente</u>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
32. Rispetto a 3 mesi fa, come valterebbe la sua salute in generale adesso?					
	<u>Molto migliorata</u>	<u>Abbastanza migliorata</u>	<u>Più o meno uguale</u>	<u>Abbastanza peggiorata</u>	<u>Molto peggiorata</u>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Per niente	Un po'	Abbastanza	Molto	Moltissimo
	0	1	2	3	4
Rispondi alle domande utilizzando la seguente scala:					
33. Nelle ultime 4 settimane, in che misura la sua salute fisica ha limitato le sue abituali attività sociali con familiari, amici, vicini di casa o altri gruppi di persone?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
34. Nelle ultime 4 settimane, in che misura il dolore ha limitato le sue abituali attività (sia al lavoro che a casa)?.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
35. Nelle ultime 4 settimane, in che misura la debolezza o il tremore alle gambe e alle braccia ha limitato le sue abituali attività (sia al lavoro che a casa)?.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Figura 17 Scala di Norfolk, versione italiana

Questionario DN4

Il questionario consiste in 4 domande alle quali si possono dare un totale di 10 risposte, ogni SI vale 1 punto, ogni NO vale 0 punti.

Più è alto il punteggio maggiore è la probabilità che il dolore origini nel sistema nervoso. Se il punteggio totale è superiore a 4 siamo di fronte ad un dolore con caratteristiche di tipo neuropatico.

DOMANDA 1: il dolore presenta una o più delle seguenti caratteristiche?

	SI	NO
1. Bruciante/urente		
2. Sensazione di freddo doloroso		
3. Scariche elettriche		

DOMANDA 2: il dolore è associato, nella stessa area, a uno o più dei seguenti sintomi?

	SI	NO
4. Formicolio		
5. Punture di spillo		
6. Intorpidimento?		
7. Sensazione di prurito		

DOMANDA 3: il dolore è localizzato in un territorio dove l'esame obiettivo evidenzia:

	SI	NO
8. Ipoestesia al tatto		
9. Ipoestesia alla puntura		

DOMANDA 4: il dolore è provocato o accentuato da:

	SI	NO
10 Sfiocamento della pelle		

SI = 1 punto

NO = 0 punti

Punteggio del paziente: /10

Figura 18 Questionario DN4

Scaricato da:

http://www.vincereildolore.it/images/areariservata/Questionario_DN4_in_italiano.pdf

VALUTAZIONE DEL COINVOLGIMENTO DEL SISTEMA NERVOSO AUTONOMO

COMPASS31 (Composite Autonomic Symptoms Score)

Abbiamo usato il questionario COMPASS31 [51] per una valutazione standardizzata quantitativa del coinvolgimento del sistema nervoso autonomo all'interno del quadro di HSAN-IA.

Vengono esplorati 6 domini, per un totale di 31 domande, andando ad indagare, per ognuno di essi, diversi aspetti che possano mettere in evidenza la presenza di un'eventuale compromissione del SNA e il grado della stessa. Per ogni dominio viene assegnato un punteggio grezzo che deve poi essere moltiplicato per un coefficiente di correzione calcolato sulla base della rilevanza di quel determinato dominio nella valutazione globale della funzione autonoma. Il massimo punteggio ottenibile, che corrisponde al massimo grado di compromissione del SNA nell'ambito della patologia di base, è 100. I 6 domini esplorati sono :

Dominio	Numero di domande	Score grezzo	Coefficiente di correzione	Score corretto
Dominio 1: ipotensione ortostatica	4	/10	x 4.0	/40
Dominio 2: vasomotorio	3	/6	x 0.8333333	/5
Dominio 3 : secretomotorio	4	/7	x 2.1428571	/15
Dominio 4: gastrointestinale	12	/28	x 0.8928571	/25
Dominio 5: urinario	3	/9	x 1.1111111	/10
Dominio 6: pupillomotorio	5	/15	x 0.3333333	/5
Score totale		/75		/100

Tabella 2 Sintesi domini e punteggi COMPASS31

Risposta simpatico cutanea

La risposta simpatico cutanea (sympathetic skin response o SSR) rappresenta il cambiamento transitorio del potenziale elettrico cutaneo. Può essere evocata spontaneamente o in risposta ad una varietà di stimoli interni o esterni.

Si tratta di un approccio non invasivo per la valutazione della funzione del sistema simpatico nell'ottica di indagare l'eventuale presenza di una disfunzione del sistema autonomo nella sua componente sudomotoria colinergica simpatica attraverso la risposta simpatico cutanea a un'alterazione evocata temporanea del potenziale elettrico della cute [56].

Per l'esecuzione dell'esame è necessario far sdraiare il paziente supino su un lettino posto in una stanza poco illuminata e con una temperatura mantenuta tra i 22 e i 24°C, nell'ottica di mantenere una buona omeostasi dell'organismo e il massimo stato di rilassamento possibile.

Dopo la detersione delle parti, si applicano due elettrodi registranti, uno sul palmo della mano e uno sulla pianta del piede, due zone estremamente ricche di ghiandole sudoripare, e i rispettivi due elettrodi di riferimento, uno a livello del dorso della stessa mano e uno sul dorso dello stesso piede.

Nel nostro caso, per evocare la risposta è stato usato uno stimolo acustico inatteso dato dal battito delle mani dell'operatore. In alcune occasioni è stato necessario fornire stimoli misti (acustico e elettrico applicato a livello del nervo mediano) per aumentare l'ampiezza della risposta.

Sulla base di quanto registrato dagli elettrodi si ottiene un grafico che rappresenta la risposta simpatica cutanea. Da questo si possono ottenere informazioni riguardo la latenza e l'ampiezza della risposta. Tuttavia il dato principale rimane la presenza/assenza della risposta stessa.

RM MUSCOLARE

Esame condotto al T0 con acquisizione di sequenze TSE T1-pesate sui piani assiali. È stata eseguita senza mezzo di contrasto su coscia dx e sn e su gamba dx e sn in entrambe le pazienti.

Per la valutazione del grado di degenerazione muscolare è stata usata la Scala Mercuri modificata da Fischer et al. nel 2008 [57]:

- 0 → aspetto muscolare normale (nessuna infiltrazione adiposa)
- 1: lieve → tracce di aumentata intensità di segnale sulle sequenze T1 pesate
- 2: moderata → aumento dell'intensità del segnale in sequenze T1 con confluenza < al 50% del muscolo
- 3: grave → aumento dell'intensità del segnale in sequenze T1 con confluenza > al 50% del muscolo
- 4: end-stage → Muscolo completamente infiltrato

DOSAGGIO SFINGOLIPIDI SU SIERO

Si esegue un prelievo di siero a digiuno per il dosaggio degli sfingolipidi. Allo scopo si utilizza una comune provetta con separatore di siero (tipo BD Vacutainer tappo viola da 4 ml). Una volta ottenuto il siero per centrifugazione, lo si aliquota in 2

microprovette tipo Eppendorf 1.5 ml e lo si mette in congelatore a -20 °C. Tutte le fasi precedentemente descritte si devono svolgere a temperatura ambiente.

I campioni sono stati inviati per lo studio presso il National Institute of Health a Bethesda (USA).

I lipidi sono stati estratti, separati mediante cromatografia in fase liquida ad alta prestazione (HPLC) e infine analizzati, quantificati e caratterizzati mediante spettrometria di massa (MS). In particolare è stato utilizzato il macchinario HPLC Agilent Serie 1200 accoppiato a un ABSciex QTRAP 4000 MS. Per l'analisi dei dati è stato usato il programma ABSciex Analyst.

DOSAGGIO AMMINOACIDI PLASMATICI E URINARI

La determinazione quantitativa degli amminoacidi in plasma e urine è stata condotta per monitorare eventuali alterazioni quantitative e conseguenti squilibri sistemici secondari alla supplementazione e per verificare l'aderenza alla terapia delle pazienti.

La determinazione quantitativa degli amminoacidi nel plasma è stata condotta su plasma da prelievo a digiuno.

La determinazione quantitativa degli amminoacidi nelle urine è stata invece condotta su campioni di urina raccolti in ospedale.

Le due determinazioni quantitative sono state condotte tramite cromatografia a scambio ionico presso il Laboratorio per lo studio degli errori congeniti del metabolismo (LABSIEM).

Unità di misura per il dosaggio degli amminoacidi plasmatici: $\mu\text{mol/L}$.

Unità di misura per il dosaggio degli amminoacidi urinari: $\mu\text{mol}/\text{mmCRE}$.

BIOPSIA DI NERVO

Dato il carattere di invasività della biopsia di nervo, questa è stata condotta solo sulla paziente 1 in occasione dell'intervento ortopedico di correzione del piede sinistro equino-varo-supinato eseguito nel novembre 2020. La biopsia è stata condotta sul nervo surale omolaterale a livello retromalleolare (malleolo laterale).

Il materiale bioptico è stato inviato presso i laboratori dell'ospedale Policlinico San Martino. Qui, una sezione del campione è stata fissata in paraformaldeide 2% e inclusa in paraffina per le normali sezioni istologiche (10-15 μ m) longitudinali e trasversali e il successivo studio in microscopia ottica. Un'altra porzione del campione è stata invece fissata in glutaraldeide 5% e inclusa in Epon[®], una resina epossidica, per ottenere sezioni destinate allo studio in microscopia elettronica (ME).

Le sezioni in paraffina sono state sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina, colorazione tricromica di Mallory, colorazione tricromica di Masson.

Le sezioni in resina per la microscopia elettronica sono state invece trattate con acetato d'uranile e citrato di piombo.

BIOPSIA DI CUTE

Studio delle piccole fibre

La biopsia di cute è stata condotta in occasione della visita al baseline. Nella paziente 1 è stato asportato un punch di 3mm di spessore dalla superficie anteriore del terzo distale della coscia mentre nella paziente 2 dalla regione posteriore della gamba, previo trattamento con lidocaina. La sutura post biopsia è stata fatta mediante steryl-strips.

Il materiale bioptico è stato poi inviato presso il laboratorio Biopsie di cute dell'ICS Salvatore Maugeri di Telese (Telese Terme, BN) per gli studi immunohistochimici sulle piccole fibre.

In particolare i campioni sono stati fissati per 5 ore in soluzione Zamboni, poi trasferiti in soluzione crioprotettiva e inviati in confezione refrigerata al Laboratorio di biopsia di cute di Napoli. I campioni sono stati tagliati in sezioni dello spessore di 50 μm e le sezioni sono state processate per l'immunofluorescenza indiretta utilizzando un pannello di Ab anti strutture neurali e vascolari. Gli anticorpi primari, di derivazione animale, includevano Ab anti-PGP9.5 (PGP; AbD Serotec, 1:800; Biogenesi; 1:400), un marker pan-neuronale che marca tutti gli assoni di qualsiasi calibro, Ab anti MBP (MBP: proteina basica della mielina; Santa Cruz Biotechnology; 1:800) per valutare le fibre mieliniche, Ab anti-VIP (VIP: peptide intestinale vasoattivo; Santa Cruz Biotechnology, 1:300) per valutare le fibre colinergiche e Ab anti D β H (D β H: dopamina-betaidrossilasi, Chemicon, 1:1000) per valutare fibre noradrenergiche.

Il letto vascolare e le membrane basali sono stati marcati con anticorpi di topo anti-collagene di tipo IV (COLIV; Chemicon; 1:800) mentre l'endotelio e l'epidermide sono stati marcati con l'agglutinina 1 di *Ulex europaeus*. Le strutture di interesse sono state quindi visualizzate utilizzando anticorpi secondari specie-specifici associati ai marcatori fluorescenti cianina 2 e cianina 3. Le immagini digitali sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale non laser (Apotome; Zeiss).

Studio su fibroblasti

La biopsia di cute per lo studio dei fibroblasti è stata condotta, al T0, con punch 3 mm su regione scapolare dell'avambraccio previo trattamento con lidocaina e sutura con steryl strip post prelievo. Il materiale bioptico è stato poi opportunamente inviato presso il National Institute of Health (NIH) di Bethesda (USA). Qui le cellule sono state estratte, espanse e coltivate in DMEM ad alto contenuto di glucosio (Sigma) integrato con FBS 10% e penicillina/streptomicina.

Il terreno di coltura è stato poi cambiato in DMEM integrato con D3-15N-l-serina (1 mM) e D4-l-alanina (2 mM) marcati con isotopi (Cambridge Isotope Laboratories).

Per il profilo lipidomico il pellet cellulare (0,1-0,2 mg di lisato cellulare) è stato miscelato con 1 ml di metanolo contenente 62,5 pmol di standard interno (Avanti Polar Lipids, n. LM6002), l'estrazione dei lipidi è stata eseguita tramite miscelazione continua dei campioni in un Thermomixer (Eppendorf) a 37 °C. Il surnatante monofase è stato raccolto, essiccato sotto N₂ e sciolto in 70 µl di metanolo.

L'analisi dei lipidi è stata eseguita mediante un analizzatore Q-Exactive MS ad alta risoluzione (Thermo Fisher). Lo spettrometro di massa è stato impostato per rilevare i composti in modalità di monitoraggio di reazioni multiple (MRM) in una corsa a doppio periodo. Ciascun campione è stato normalizzato alla concentrazione proteica.

DISEGNO TRIAL TERAPEUTICO CON SUPPLEMENTAZIONE DI L-SERINA

Sulla base dei risultati del trial terapeutico randomizzato, pubblicati nel 2019 da Vera Fridman et al. [42], che hanno dimostrato la sicurezza della supplementazione orale di L-serina ad alte dosi in pazienti adulti affetti da HSAN-I e la sua potenziale efficacia nel rallentare la progressione della malattia, abbiamo intrapreso il tentativo di supplementazione di questo amminoacido nelle due pazienti pediatriche.

Le pazienti sono state sottoposte inizialmente a una **visita di screening** durante la quale è stata spiegata e proposta alle famiglie la supplementazione; è stato discusso e ottenuto il consenso. Sono state quindi condotte:

- valutazione dietologica
- valutazione endocrinologica
- dosaggio sierico degli sfingolipidi

per ottenere i dati necessari ad un razionale avvio della supplementazione di L-serina.

È stata poi condotta la **valutazione al baseline (T0)** per delineare un tempo 0, prima dell'inizio della supplementazione.

Nel corso delle valutazioni di T0 sono stati eseguiti:

- Valutazione generale e neurologica
- Somministrazione della scala CMT pediatrica
- Studio neurofisiologico (Sympathetic skin response)
- Prelievo di siero per dosaggio sfingolipidi
- Determinazione quantitativa amminoacidi in plasma e urine

- Biopsia di cute per:
 - studio delle piccole fibre
 - studio su fibroblasti
- RMN muscolare

È stata quindi avviata l'integrazione con L-serina calibrata in base al peso ed è stato programmato un aumento del dosaggio graduale, con possibilità di valutazione endocrinologica ai vari controlli.

È stata inizialmente prescritta una sola somministrazione al giorno (da assumere al mattino) per la prima settimana di trattamento, aumentata poi a due somministrazioni al giorno (mattino e pomeriggio) per la seconda settimana, per arrivare infine a tre somministrazioni al giorno (mattino, pomeriggio e sera) la terza settimana, mantenute nelle settimane successive di trattamento.

Secondo indicazione degli specialisti endocrinologi, la dose di L-serina può essere aumentata gradualmente sino ad un massimo di 400 mg/kg/die con eventuali aumenti di dosaggio ad intervalli di almeno 3 settimane di terapia alla stessa dose.

La L-serina viene somministrata in forma di polvere da sciogliere in un liquido da consumare insieme a un pasto. È stato consigliato alle famiglie di diluire la polvere in un succo di frutta per rendere la somministrazione più gradita alle bambine.

Sono state eseguite poi **valutazioni di follow-up (T1-T2...Tx)**, condotte in regime di DH o in occasione di ricoveri presso l'Istituto per altre ragioni, a cadenza circa bimestrale o trimestrale.

Nel corso delle valutazioni di follow-up sono state condotte:

- Valutazione generale e neurologica
- Somministrazione della scala CMT pediatrica
- Studio neurofisiologico (Sympathetic skin response)
- Prelievo di siero per dosaggio sfingolipidi
- Determinazione quantitativa amminoacidi in plasma e urine
- Monitoraggio eventi avversi (i più comuni: cefalea, dolore gastrico e irrequietezza)

La **valutazione end of study**, programmata a 12 mesi dall'inizio della supplementazione, prevede:

- Valutazione generale e neurologica
- Visita da nutrizionista e endocrinologo
- Somministrazione della scala CMT pediatrica
- Studio neurofisiologico (Sympathetic skin response)
- Prelievo di siero per dosaggio sfingolipidi
- Determinazione quantitativa amminoacidi in plasma e urine
- Biopsia di cute per piccole fibre
- Monitoraggio eventi avversi

Gli approfondimenti riguardo i diversi esami elencati si trovano nei paragrafi precedenti.

Capitolo 4: Risultati

PAZIENTI

PAZIENTE 1

La paziente 1 è una bambina italiana di 14 anni, portatrice della mutazione p.S331Y de novo del gene SPTLC1.

È stata presa in carico presso l'Istituto Giannina Gaslini all'età di 10 anni con diagnosi di neuropatia sensitiva e motoria.

Prima figlia di genitori sani e non consanguinei, la bambina ha presentato una fisiologica acquisizione delle tappe motorie e normale accrescimento staturponderale. Tuttavia all'età di 4 anni i genitori hanno iniziato a notare la comparsa di un impedimento motorio globale descritto inizialmente come una goffaggine, evidente in particolare nella corsa e nel salire le scale; i sintomi si sono progressivamente accentuati con lo sviluppo nel tempo di precoce stancabilità. L'esame neurologico effettuato in quel periodo ha messo in evidenza deambulazione con prevalente appoggio in punta, lieve impaccio a livello degli arti superiori e riflessi vivaci per i quali la paziente è stata sottoposta a RM cerebrale e spinale che hanno dato esito negativo. Alla stessa età la paziente lamentava anche dolori addominali ricorrenti, all'epoca di non definita diagnosi, e un discomfort aspecifico alle dita durante il taglio delle unghie e al cuoio capelluto nello spazzolarsi i capelli. Questi sintomi sono stati però sottovalutati e sono scomparsi con il tempo. I sintomi riguardanti la sfera motoria sono invece diventati sempre più evidenti con sviluppo di sempre maggiore debolezza e

atrofia soprattutto a livello dei muscoli distali, andatura steppante, tremori alle mani e piede cavo con dita engriffe.

All'età di 8 anni sono state eseguite elettromiografia (EMG), potenziali evocati visivi (PEV), elettroretinogramma (ERG) che sono risultati nella norma e sono stati eseguiti gli studi di conduzione nervosa che hanno documentato segni di neuropatia sensitiva e motoria di tipo misto demielinizzante e assonale più grave a livello degli arti inferiori.

In particolare:

Sensory NCS

Nervo/posizioni	Latenza	Ampiezza	Velocità
N. mediano (polso)	dx: 1,7 ms sn: 1,7 ms	dx: 7,4 mV sn: 4,2 mV	dx: 59,9 m/s sn: 62,9 m/s
N. surale e peroneo superficiale (polpaccio)	NR	NR	NR

Tabella 3 Sensory NCS paziente 1

Gli studi di conduzione sensitiva hanno messo in evidenza a livello dell'arto superiore VCS nei limiti e discreta riduzione di ampiezza dei SAPs mentre a livello dell'arto inferiore (n. peroneo superficiale e nervo surale) SAPs non chiaramente identificabili.

Motor NCS

Nervo/posizioni	Latenza	Ampiezza	Velocità
N. mediano (polso-mano)	dx: 2,8 ms sn: 2,8 ms	dx: 8,4 mV sn: 7,5 mV	dx: 41,4 m/s sn: 42,9 m/s

N. tibiale	dx: 12,7 ms	dx: 0,9 mV	dx: 28,2 m/s
(cavo p.-malleol)	sn:12,7 ms	sn: 1,6 mV	sn: 32,6 m/s)

Tabella 4 Motor NCS paziente 1

Gli studi di conduzione motoria hanno invece messo in evidenza a livello dell'arto superiore VCM rallentate e CMAPs di ampiezza moderatamente ridotta mentre a livello dell'arto inferiore VCM significativamente rallentate e CMAPs di ampiezza nettamente ridotta.

I potenziali evocati sensitivi (SEP) hanno messo in evidenza alterazioni della conduzione periferica e non evocabilità della risposta corticale conducendo quindi a una diagnosi di polineuropatia periferica sensitivo motoria di tipo misto in fase di inquadramento diagnostico.

Visto l'orientamento verso una forma su base genetica è stata avviata l'analisi quantitativa del gene PMP22 risultata negativa per la duplicazione del tratto 17p11.2-12 associata a CMT di tipo IA.

È stata dunque avviata l'esecuzione del pannello multigene NGS per geni malattia coinvolti nella patogenesi delle neuropatie periferiche. L'analisi di sequenza ha evidenziato la presenza della mutazione de novo p.S331Y del gene SPTLC1, descritta da Auer-Grumbach et al. nel 2013 [18]. È stata eseguita la ricerca della stessa mutazione anche nei genitori e nel fratello minore con risultato negativo.

Il quadro della paziente è stato valutato da uno specialista di malattie rare che riteneva che la sintomatologia motoria, sensitiva e disautonomica (dolori addominali) poteva essere spiegata dalla mutazione genetica riscontrata mentre la restante sintomatologia

poteva essere secondaria al disturbo emozionale della bambina correlato alle sue disabilità.

Negli anni successivi l'ipostenia è diventata sempre più debilitante con perdita della deambulazione autonoma e importante ipostenia a carico delle mani dall'età di 10 anni.

Nello stesso periodo la paziente ha iniziato a lamentare parestesie dolorose agli arti inferiori trattate con successo tramite gabapentin.

Nel corso delle varie visite di controllo sono emerse anche scoliosi lombare sinistro convessa e deformazione progressiva dei piedi. Per questo, nel novembre 2020 la paziente è stata sottoposta a intervento chirurgico di correzione del piede sinistro equino-varo-supinato.

All'età di 11 anni sono emersi problemi nella funzionalità respiratoria con il riscontro di un disturbo di tipo restrittivo che ha richiesto l'avvio dell'utilizzo del supporto ventilatorio notturno (NIV).

Nel corso degli anni la paziente non ha mai lamentato problemi agli occhi né si sono ripresentati particolari disturbi gastrointestinali, presenti nei primi anni d'età.

Le funzioni cognitive sono normali.

All'ultimo studio della conduzione nervosa i potenziali motori e sensitivi non erano evocabili né a livello degli arti superiori né a livello degli arti inferiori.

Le valutazioni di particolare interesse nell'ambito del presente elaborato sono iniziate nel luglio 2020 in occasione di un day-hospital organizzato per informare la famiglia riguardo la possibilità di partecipare al trial terapeutico di supplementazione con L-

serina. Ottenuto il consenso, è stata valutata la conformità della paziente con i requisiti necessari all'avvio della terapia mediante le valutazioni di screening. Verificata l'idoneità, la bambina è stata sottoposta alle valutazioni del T0 (Capitolo 3 - "Disegno trial terapeutico con supplementazione di L-serina").

Visita neurologica T0: paziente in buone condizioni generali, sintonica e collaborante. All'esplorazione dei nervi cranici riscontro di atrofia e fascicolazioni della lingua e palato ogivale con porzione posteriore ipomobile. Ipostenia, ipotonia e ipotrofia generalizzate, prevalenti a livello dei muscoli distali degli arti inferiori. Presente anche ipostenia prossimale, a livello degli arti superiori, con conseguenti incapacità di sollevare le braccia sopra le spalle e necessità di supporto esterno nei passaggi posturali. A livello degli arti inferiori si riscontrava incapacità al mantenimento del Mingazzini con conservata capacità di sollevamento degli arti dal piano di appoggio. La paziente manifestava incapacità all'autonomo mantenimento della postura eretta e alla deambulazione.

Presenza di deformità delle mani (dita engriffe – **Figura 19 A e B**) e di piedi cavi equino-varo-supinati (**Figura 19 C**)

Dal punto di vista del coinvolgimento sensitivo la paziente presentava ipo-anestesia termodolorifica a prevalente coinvolgimento distale. I riflessi osteotendinei erano assenti. Punteggio alla CMTPed scale di 33/44.

Alle valutazioni successive non è stato riferito in anamnesi e non è stato riscontrato all'esame obiettivo alcun miglioramento del quadro clinico della paziente se non un

netto miglioramento della deformità e del conseguente appoggio del piede sinistro operato a novembre (**Figura 19 D**). Al controllo di marzo è stata riscontrata la presenza di un'ulcera da decubito indolente sulla pianta del piede destro secondaria al maggiore appoggio su questo a seguito dell'intervento a carico del piede controlaterale.

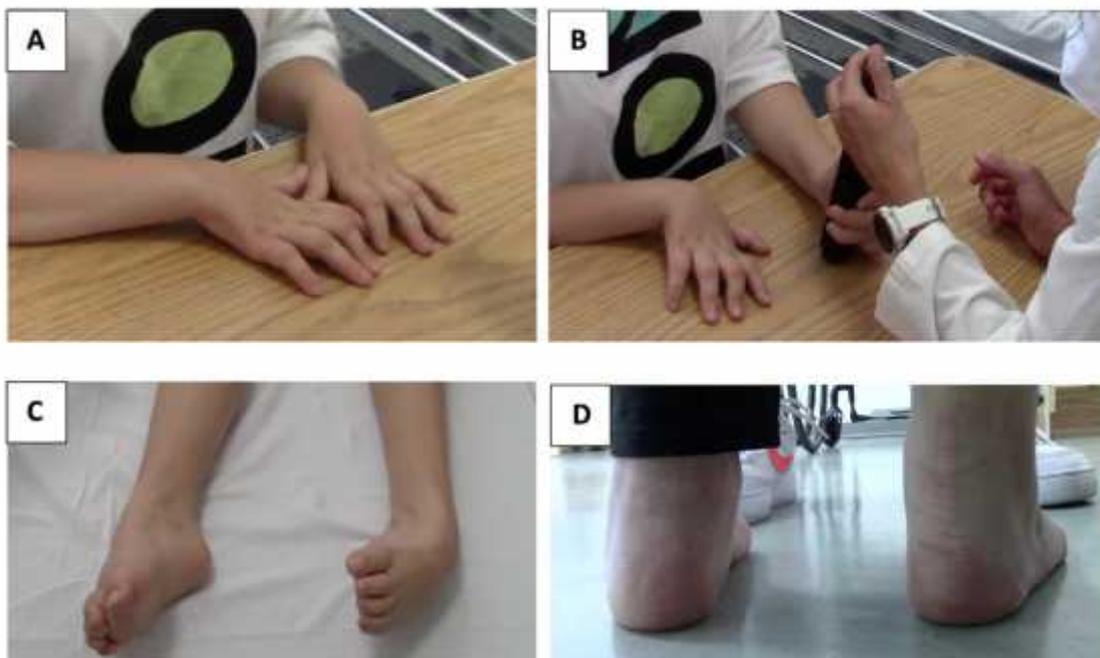


Figura 19 Caratteristiche fenotipiche paziente 1. **(A)** e **(B)** Deformità delle mani con dita engriffe. **(C)** Deformità dei piedi equino-varo-supinati. **(D)** Piedi della paziente dopo la correzione chirurgica del piede sinistro

PAZIENTE 2

La paziente 2 è una bambina italiana di 6 anni, portatrice della mutazione p.S331F de novo del gene SPTLC1.

La bambina, prima figlia di genitori sani e non consanguinei, ha avuto un esordio molto precoce di malattia, simil miopatia congenita, con ritardo dell'acquisizione delle tappe motorie (deambulazione autonoma raggiunta a 20 mesi), piede torto (>sinistra), ipotrofia e ipotonia muscolare diffusa.

Già nei primi mesi di vita ha manifestato una sintomatologia gastrointestinale, riconducibile al quadro disautonomico (reflusso gastro-esofageo, scarso appetito, sazietà precoce, rallentato svuotamento gastrico, nausea, frequenti eruttazioni).

Questa sintomatologia è sicuramente uno dei fattori che hanno contribuito allo stato di deficit ponderale che caratterizza la bambina sin dalla nascita. La paziente ha avuto infatti una crescita regolare fino al quinto mese poi è andata incontro a un progressivo rallentamento, per cui è stata alimentata per alcuni mesi con sondino oro-gastrico. Questi sintomi si sono quasi del tutto risolti intorno ai 2 anni di vita, anche se i parametri di crescita si sono sempre mantenuti al di sotto del 3° percentile. In questo periodo la bambina è stata sottoposta a visita oculistica che ha messo in evidenza abrasioni corneali multiple e segni iniziali di cataratta.

A causa della persistenza di ipotonia, frequenti cadute, atrofia muscolare diffusa e piede torto, la bambina all'età di 3 anni è stata sottoposta a biopsia muscolare del quadricipite sinistro, che ha evidenziato un quadro compatibile con una diagnosi di miopatia congenita. Tuttavia le indagini genetiche per le forme più comuni di miopatia non sono risultate conclusive.

Il quadro clinico globale necessitava di un preciso inquadramento in ambito neuromuscolare per cui nel 2019, all'età di 3 anni e mezzo, la paziente è stata indirizzata presso l'Istituto Giannina Gaslini. Alla prima visita l'esame neurologico ha documentato normali funzioni cognitive, ipotonia muscolare diffusa, riflessi rotulei vivaci e assenti gli achillei e i riflessi a livello degli arti superiori. La deambulazione era possibile sulla punta dei piedi ma non sui talloni. Presentava inoltre sensibilità ridotta nella parte distale degli arti inferiori. È stato quindi eseguito uno studio elettrofisiologico:

Sensory NCS

Nervo/posizioni	Latenza	Ampiezza	Velocità
N. mediano (polso)	Peak lat 3,26 ms	NP Amp 6,7 uV	23 m/s
N. surale (polpaccio)	NR	NR	NR

Tabella 5 Sensory NCS paziente 2

SAP del nervo surale non rilevabile, del nervo mediano di ampiezza e VCS ridotta.

Motor NCS

Nervo/posizioni	Latenza	Ampiezza	Velocità
N. peroneo-EDB (caviglia)	3,23 ms	6,7 mV	28 m/s

Tabella 6 Motor NCS paziente 2

CMAP di ampiezza e VCM diffusamente ridotta.

È stato quindi riscontrato un quadro compatibile con polineuropatia sensitivo-motoria lunghezza dipendente con danno di tipo misto demielinizzante e assonale con maggiore coinvolgimento degli arti inferiori.

Vista la storia clinica della bambina e i parametri elettrofisiologici compatibili con un'eziologia su base genetica, sono state avviate le indagini genetico-molecolari per lo studio dei geni associati a neuropatie periferiche ereditarie, da cui è emersa la mutazione de novo p.S331F del gene SPTLC1 nell'estate del 2020.

È stata subito discussa con i genitori la possibilità di iniziare la supplementazione con L-serina e, ottenuto il consenso, a dicembre 2020 la paziente è stata sottoposta alle indagini di screening (visita dietologica, endocrinologica e dosaggio sfingolipidi su siero) e alle valutazioni del T0. A seguito del riscontro di aumentati livelli di deossi-sfingolipidi atipici nel siero della paziente e del giudizio di idoneità da parte degli endocrinologi la bambina ha iniziato ad assumere L-serina.

Il quadro clinico della paziente in occasione della visita neurologica al T0 è risultato paragonabile a quanto precedentemente descritto. La bambina presentava un peso di 13.8 kg (<3° percentile) e un'altezza di 109.5 cm (10°-25° percentile) con conseguente BMI di 11.5 kg/m². Per quanto riguarda questi aspetti la bambina è seguita da un gastroenterologo e viene sottoposta a controlli da parte di dietologi in occasione di tutti i day hospital.

All'esame obiettivo neurologico la bambina si presentava vigile, orientata e collaborante. Nessuna alterazione a carico dei nervi cranici.

La paziente mostrava ipotonia, ipotrofia e ipostenia generalizzate, prevalentemente a livello distale (**Figura 20 B**) con riportata lieve alterazione della motricità fine. I ROT patellari risultavano ridotti mentre gli achillei assenti.

La deambulazione era autonoma a base allargata con basculamento del bacino, parzialmente possibile sulle punte e non possibile sui talloni. Presentava un certo grado di impaccio motorio e in anamnesi frequenti cadute. I passaggi posturali erano autonomi con compensi. Il salto era possibile con minima elevazione.

Si segnalava importante lassità legamentosa delle dita delle mani ma non lassità cutanea. Colonna clinicamente in asse.

La bambina presentava inoltre atteggiamento in flessione di braccia e polsi durante la deambulazione e la stazione eretta (**Figura 20 A**).

Alla valutazione clinica si riscontrava la presenza di ipoestesia termodolorifica distale. Punteggio alla CMTPedS 24/44.

In occasione della visita la madre ha riferito la totale assenza di sudorazione anche in presenza di temperatura ambientale molto elevata, accentuazione della sazietà precoce, dolori addominali e frequenti episodi di difficoltà ad urinare, suggerendo la compromissione di diversi domini del SNA.

Un'ulteriore valutazione oculistica ha documentato la presenza di opacità del cristallino, cheratopatia bilaterale che espone la paziente a frequenti abrasioni corneali e grave iposecrezione lacrimale, aspetti che vengono monitorati da specialisti sia presso la città di residenza sia presso l'Istituto in occasione dei day-hospital.

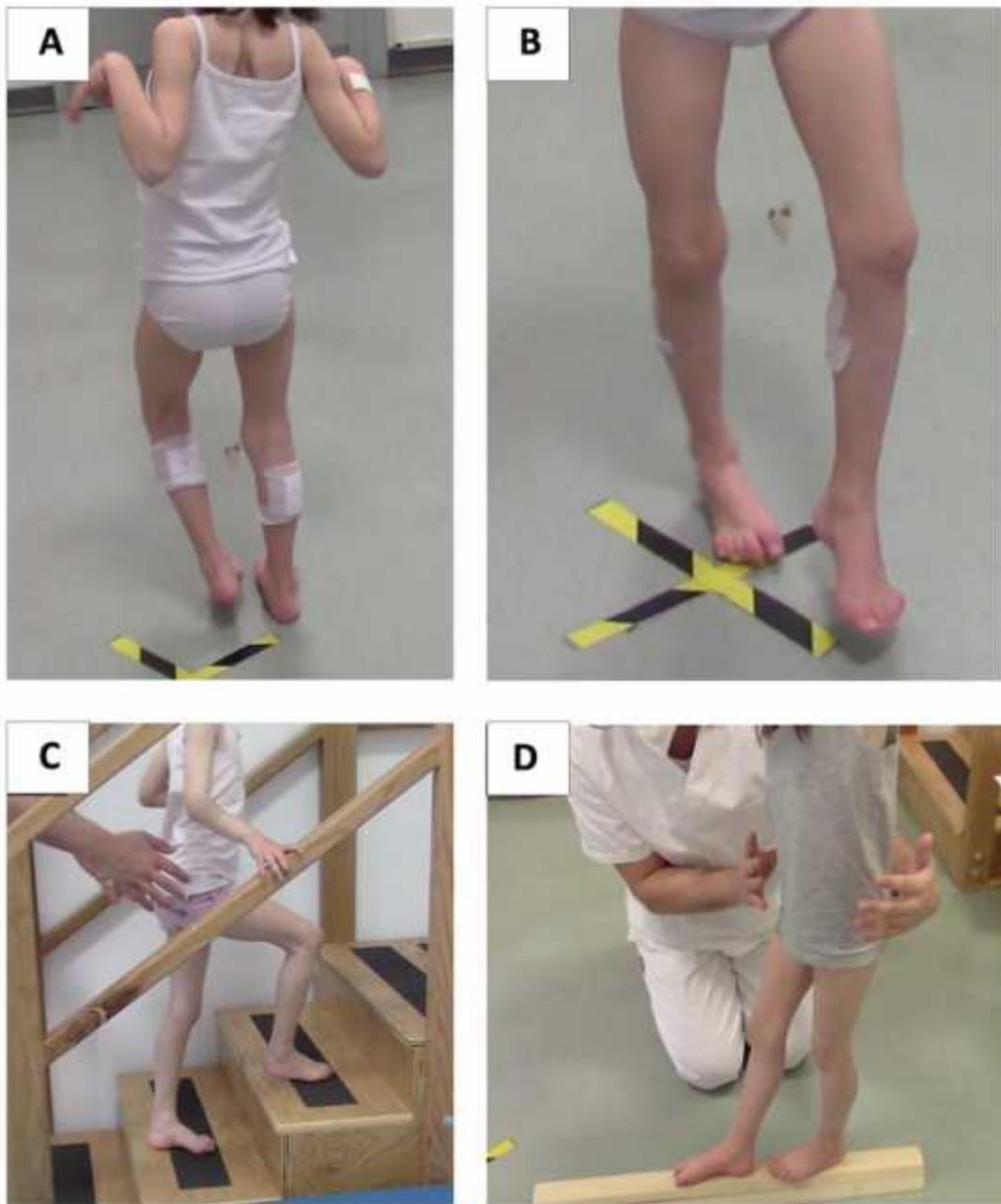


Figura 20 Caratteristiche fenotipiche paziente 2. **(A)** Atteggiamento in flessione di braccia e polsi durante la deambulazione durante la quale manifesta basculamento **(B)** Ipotrofia arti inferiori **(C)** Conservata capacità di salire le scale con appoggio **(D)** Conservata capacità di mantenimento dell'equilibrio su trave.

SCALA CMT PEDIATRICA (CMTPedS)

La scala CMT pediatrica è stata somministrata a entrambe le pazienti in occasione dei periodici controlli nel corso del trial ed il punteggio ottenuto è stato utilizzato come una delle misure di outcome.

	T0	T1	T2	T3
Paziente 1	33/44	37/44	22/44 <small>(NO valutazione destrezza manuale per mancata disponibilità dell'attrezzatura)</small>	35/44
Paziente 2	24/44	19/44	18/44	

Tabella 7 Punteggi CMTPedS paziente 1 e paziente 2

Nonostante le poche valutazioni possiamo osservare che la paziente 1 presenta punteggi alti con una media - senza contare la valutazione al T2 per la mancata disponibilità del materiale per eseguire alcuni items - di 35/44, senza evidenza di miglioramento dopo l'inizio della supplementazione con L-serina. Il dato grezzo è anzi quello di un peggioramento dello score passando da un punteggio di 33/44 al T0 a uno di 35/44 all'ultima valutazione con un picco di 37/44 al T1, dopo i primi 2 mesi di terapia. In particolare è difficile valutare l'andamento dei singoli items poiché, sono stati riscontrati valori oscillanti migliorativi e peggiorativi senza una particolare progressività nel tempo in tutti gli items valutabili. È infatti da tenere in considerazione il fatto che la paziente, non essendo deambulante, non può essere testata in items quali equilibrio, cammino e salto in lungo. Per quanto riguarda la componente sensitiva la paziente presenta una diminuita sensibilità sia puntoria sia vibratoria al di sotto della linea di metà gamba che si sono dimostrate stabili in tutte le valutazioni.

La paziente 2 invece, dopo l'inizio della supplementazione di L-serina, ha presentato punteggi alla CMTPedS sempre più bassi, fino ad arrivare a uno score 18/44 in

occasione dell'ultima valutazione. In particolare la bambina manifesta una diminuzione della sensibilità puntoria al di sotto della linea di metà gamba ma sembra avere una conservata sensibilità vibratoria. Questi aspetti non sono variati nel corso delle successive valutazioni. Si sono riscontrati lievi miglioramenti nelle prove di valutazione dell'equilibrio e nelle prove di forza.

ALTRE VALUTAZIONI PER LO STUDIO DEL COINVOLGIMENTO DELLA COMPONENTE SENSITIVA

Valutazione sensibilità termica

Entrambe le pazienti hanno mostrato una severa alterazione della sensibilità termica sia per quanto riguarda la sensibilità al freddo sia per quanto riguarda la sensibilità al caldo con gradiente di gravità disto-proximale a livello degli arti.

Scala di Norfolk

PAZIENTE 1

La paziente ha ottenuto un punteggio totale di 53/140.

- Parte I: sintomi → punteggio 5/28. La bambina soffre di debolezza a livello di braccia, mani, gambe e piedi. Questo quadro è in linea con quanto riscontrato all'esame obiettivo.
- Parte II: attività quotidiane → punteggio 48/112. La paziente ha lamentato gravi problemi nella motricità fine e di conseguenza nel vestirsi, usare le posate. Ha inoltre riferito lievi problemi nel distinguere l'acqua calda da quella fredda con le mani e i piedi, coerentemente con quanto riscontrato durante la visita. È

stato assegnato un punteggio corrispondente al massimo grado di impedimento alle voci riguardo il mantenimento della stazione eretta, il cammino e i passaggi posturali.

Ha dichiarato di non aver avuto problemi, nell'ultimo mese, nell'andare a scuola o svolgere altre attività a causa del suo stato di salute che ha definito in generale "buono" nonostante abbia lamentato un lieve peggioramento rispetto ai mesi precedenti.

PAZIENTE 2

La paziente ha ottenuto un punteggio totale di 29/140.

- Parte I: sintomi → punteggio 2/28. La mamma della paziente ha riferito che talvolta la bambina lamenta formicolii a mani e piedi ma nessun altro sintomo.
- Parte II: attività quotidiane → punteggio 27/112. La mamma ha dichiarato che è capitato che la bambina si sia bruciata o ferita senza sentire alcun dolore e problemi di lievissima entità nel compiere movimenti fini, nel lavarsi, nel vestirsi, talvolta nei passaggi posturali (sedersi e alzarsi da seduta). Ha poi segnalato episodi in cui la bambina è poco stabile sulle gambe e in particolare come problema di media entità il camminare autonomamente per la presenza di impaccio motorio e frequenti cadute. È stata inoltre segnalata difficoltà nello scendere le scale.

La bambina non ha avuto problemi, nel mese precedente, nell'andare a scuola o nello svolgere altre attività a causa del suo stato di salute, definito in generale dalla mamma "molto buono" e stabile rispetto ai 3 mesi precedenti.

Questionario DN4

PAZIENTE 1

La paziente ha ottenuto un punteggio di 5/10, per cui, secondo il questionario, la paziente presenta un dolore con caratteristiche di tipo neuropatico.

In particolare il dolore è localizzato dalla bambina a livello degli arti inferiori, territori in cui l'esame obiettivo evidenzia ipoestesia al tatto e alla puntura. La paziente ha descritto il dolore associato, nella stessa area, a sensazione di intorpidimento e sensazione di prurito. Riferisce inoltre che il dolore è tipicamente provocato o accentuato dallo sfioramento della pelle.

Il risultato del questionario è coerente con la precedente diagnosi, effettuata nel 2017 nel corso di una consulenza con i terapisti del dolore, di sintomi neuropatici soprattutto positivi (parestesie, iperpatia sino all'allodinia) a livello dell'addome e degli arti inferiori, estremamente fastidiosa e debilitante, con accessi improvvisi, seguiti spesso da risoluzione spontanea. La paziente è infatti in trattamento dal 2017 con farmaci adiuvanti (Gabapentina e Amitriptilina).

PAZIENTE 2

La paziente ha ottenuto un punteggio di 3/10, per cui, secondo il DN4, non si può parlare di dolore di tipo neuropatico.

In particolare la mamma riferisce che le disestesie lamentate talvolta dalla bambina sono localizzate prevalentemente nei territori dove l'esame obiettivo evidenzia ipoestesia al tatto e alla puntura (porzione distale degli arti, >AAll).

VALUTAZIONE DEL COINVOLGIMENTO DEL SISTEMA NERVOSO AUTONOMO

COMPASS331 (Composite Autonomic Symptoms Score)

PAZIENTE 1

Dominio	Score	Score corretto
Ipotensione ortostatica	0/10	0/40
Vasomotorio	4/6	3,33/5
Secretomotorio	0/7	0/15
Gastrointestinale	5/28	4,46/25
Urinario	0/9	0/10
Pupillomotorio	2/15	0,67/5
TOTALE	11/75	8,46/100

Tabella 8 Risultati COMPASS331 paziente 1

È stato calcolato uno score corretto totale di 8,46/100. Nel complesso la paziente 1 non presenta ad oggi un importante coinvolgimento del SNA. In particolare:

- Dominio vasomotorio: la paziente ha riportato di notare episodi di cambiamento di colore della cute a livello di mani e piedi;
- Dominio secretomotorio: la bambina ha notato di sudare un po' di più rispetto a prima sempre a livello di mani e piedi. Questo dato non è coerente con l'anidrosi tipica di quadri disautonomici dei pazienti HSAN-I. La mamma ha riportato in anamnesi la sensazione di occhi asciutti lamentata dalla bambina durante i primi anni di vita ma ad oggi non più presente. Questi due aspetti hanno fatto in modo che venisse assegnato a questo dominio un punteggio di 0;

- Dominio gastrointestinale: la paziente ha dichiarato di saziarsi molto più velocemente rispetto al passato, ha avuto rari attacchi di diarrea ad oggi completamente risolti;
- Dominio pupillomotorio: occasionale lieve sensazione di fastidio agli occhi alla luce intensa.

PAZIENTE 2

Dominio	Score	Score corretto
Ipotensione ortostatica	0/10	0/40
Vasomotorio	4/6	3,33/5
Secretomotorio	2/7	4,29/15
Gastrointestinale	6/28	5,36/25
Urinario	4/9	4,44/10
Pupillomotorio	5/15	1,67/5
TOTALE	21/75	19,09/100

Tabella 9 Risultati COMPASS331 paziente 2

Nel complesso la paziente 2 soffre di un lieve coinvolgimento del sistema nervoso autonomo, seppur maggiore rispetto all'altra paziente, e ha ottenuto uno score totale corretto di 19,09/100.

In particolare la bambina presenta coinvolgimento di tutti i domini tranne quello riguardo l'ipotensione ortostatica:

- Dominio vasomotorio: episodi caratterizzati da cambiamento di colore della cute a livello di mani e piedi;

- Dominio secretomotorio: la mamma ha dichiarato che la bambina non ha mai sudato. Ha inoltre sensazione di occhi asciutti (xeroftalmia nel quadro di una cheratopatia sicca) alla base di ricorrenti lesioni ulcerative corneali;
- Dominio gastrointestinale: la mamma ha notato che la bambina, che fin dallo svezzamento ha sempre avuto difficoltà nell'alimentazione, nell'ultimo anno si sazia molto più velocemente di prima e lamenta spesso la sensazione di eccessiva sazietà e gonfiore dopo il pasto. Talvolta presenta dolore addominale a carattere crampiforme o con coliche;
- Dominio urinario: la bambina ha avuto frequenti episodi di difficoltà a urinare e a svuotare completamente la vescica;
- Dominio pupillomotorio: nell'ultimo anno la bambina ha avuto gravi problemi nella messa a fuoco delle immagini.

Risposta simpatico cutanea

PAZIENTE 1

La paziente era stata valutata per la prima volta dal punto di vista della risposta simpatico cutanea presso l'Istituto Neurologico Besta di Milano nel 2014 a seguito del riscontro della mutazione SPTLC1 e della conseguente diagnosi di HSAN-IA. Durante questa valutazione le risposte SSR erano ben evocabili sia a livello della mano sia a livello del piede con ampiezza nella norma e con latenza nei limiti.

Abbiamo valutato la risposta simpatico cutanea per la prima volta presso l'Istituto Giannina Gaslini al TO per avere un dato riguardo l'eventuale aggravamento della disfunzione del SNA dopo 6 anni dall'ultima valutazione e per avere il dato iniziale,

prima dell'avvio della supplementazione con L-serina, nell'ottica di valutare l'eventuale efficacia della stessa anche a livello del sistema simpatico cutaneo.

- T0: presenza di risposta sia a livello della mano sia a livello del piede, con aumento della latenza del potenziale e riduzione dell'ampiezza dello stesso a livello del piede e sola riduzione dell'ampiezza del potenziale al livello della mano;
- T1: quadro di sostanziale stabilità rispetto all'esame eseguito due mesi prima;
- T2 (6 mesi dopo T1): peggioramento rispetto al precedente controllo nella risposta a livello del piede;
- T3: invariata risposta a livello della mano e risposta non elicetabile a livello del piede.

PAZIENTE 2

- T0: presenza di risposta sia a livello del piede sia a livello della mano. A livello del piede si riscontra ampiezza del potenziale ridotta con normale latenza mentre a livello della mano alterazioni più lievi;
- T1: quadro sovrapponibile rispetto a quello della valutazione precedente;
- T2: lieve miglioramento in ampiezza della risposta rispetto al precedente controllo.

RM MUSCOLARE

PAZIENTE 1

Diffusa riduzione della massa muscolare con pressoché completa involuzione adiposa di tutte le componenti muscolari flessore-estensorie di coscia (grado 3 Scala Mercuri modificata da Fischer a livello della coscia prossimale **Figura 21 A** e grado 4 Scala Mercuri modificata da Fischer a livello della coscia distale **Figura 21 B**) e gamba bilateralmente (grado 3 Scala Mercuri modificata da Fischer a livello della gamba prossimale **Figura 21 C** e grado 4 Scala Mercuri modificata da Fischer a livello della gamba distale **Figura 21 D**).

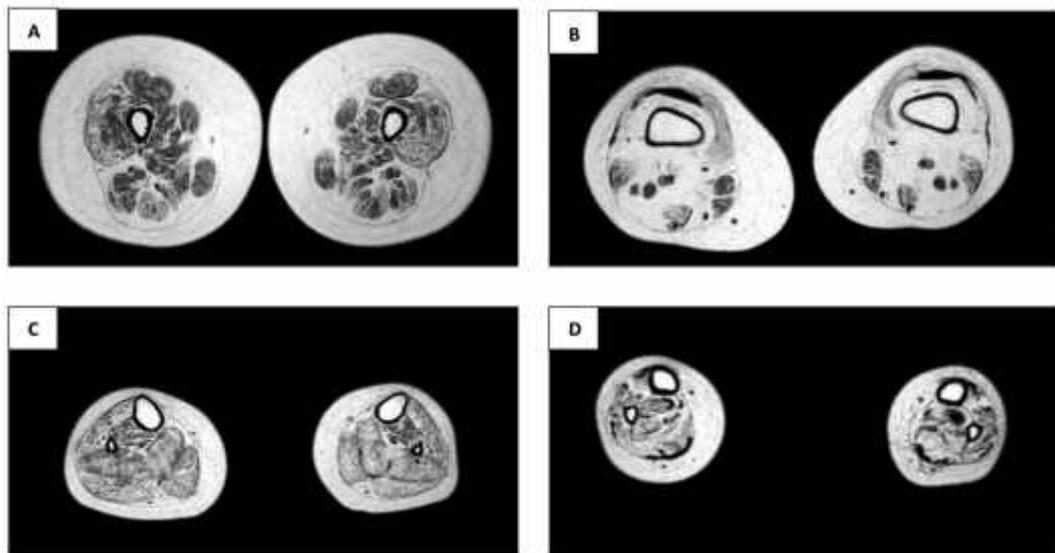


Figura 21 Immagini RM muscolare di coscia prossimale (A) e distale (B) e di gamba prossimale (C) e distale (D) paziente1.

PAZIENTE 2

Segni di sostituzione adiposa bilaterali a livello dei muscoli grande gluteo; Per quanto riguarda la coscia (**Figura 22**) sono presenti segni di sostituzione adiposa in sede sovrarotulea a livello del muscolo vasto mediale (grado 1 Scala Mercuri modificata da Fischer) e laterale (grado 1 Scala Mercuri modificata da Fischer) e posteriormente a

livello del capo breve del bicipite femorale (grado 1 Scala Mercuri modificata da Fischer). Risultano risparmiati i muscoli della parte prossimale della coscia

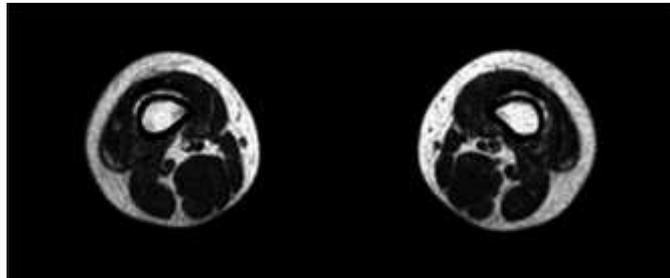


Figura 22 Immagini RM muscolare coscia distale paziente 2

Si osservano lievi segni di sostituzione adiposa a livello dei fasci muscolari anteriori e posteriori del terzo inferiore delle gambe (grado 1 Scala Mercuri modificata da Fischer) (**Figura 23**). In particolare si osservano lievi segni di sostituzione, distalmente a livello dei muscoli tibiale anteriore (grado 1 Scala Mercuri modificata da Fischer) ed estensore lungo delle dita a sinistra (grado 1 Scala Mercuri modificata da Fischer). Risultano indenni i muscoli della porzione prossimale della gamba.

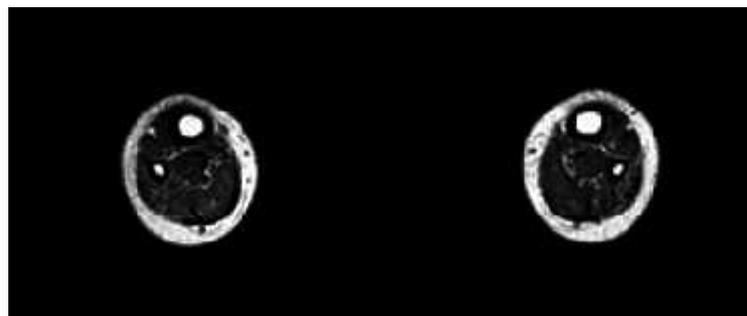


Figura 23 Immagini RM muscolare gamba distale paziente 2

DOSAGGIO SFINGOLIPIDI SU SIERO

I livelli di sfingolipidi totali nel siero di entrambe le pazienti non presentano significative differenze rispetto ai controlli sani se non per quanto riguarda le basi sfingoidi canoniche C20, i cui livelli risultano aumentati.

I livelli dei deossi-sfingolipidi atipici (1-deossiSL e 1-deossimetilSL), sono nettamente aumentati rispetto ai controlli sani.

Il riscontro di concentrazioni sieriche aumentate di questi sfingolipidi rappresenta il biomarcatore cardine di HSAN-IA da mutazioni S331.

DOSAGGIO AMMINOACIDI PLASMATICI E URINARI

Al T0 sia la paziente 1 sia la paziente 2 presentavano livelli plasmatici e urinari di L-serina nel range fisiologico, rispettivamente [70-178 umol/L] e [21-50 umol/mmCRE].

Dopo la supplementazione, in occasione di tutti i controlli, entrambe le pazienti hanno presentato valori plasmatici e urinari dell'amminoacido aumentati rispetto ai valori al T0, a conferma dell'assunzione e del buon assorbimento della molecola.

BIOPSIA DI NERVO

Nell'ottica di fornire ulteriori elementi per la caratterizzazione istopatologica della nostra paziente, e più in generale dei pazienti S331, è stata colta l'occasione dell'intervento ortopedico eseguito nel novembre 2020 per sottoporre la paziente 1, portatrice della mutazione p.S331Y, a biopsia di nervo surale.

Complessivamente, il quadro neuropatologico osservato, sia alla colorazione tricromica di Mallory (**Figura 24 A**) sia al microscopio elettronico (**Figura 24 B**), è quello di una

grave neuropatia caratterizzata da pressoché totale assenza di fibre mieliniche, di piccolo e grosso calibro, e ipertrofia connettivale, soprattutto del collagene (**Figura 24 e 25**). È stata osservata una sola fibra mielinizzata superstite che presenta grave sofferenza assonale (**Figura 24B, 25 e 26**).

È stata riscontrata una relativa conservazione delle fibre amieliniche (**Figura 27**).

Il quadro presenta inoltre importante sofferenza assonale, che sembra conseguenza della sofferenza mielinica. In un solo assone è stata osservata una compartimentalizzazione dei microtubuli che potrebbe essere interpretata, come un indice di sofferenza assonale secondaria al processo di demielinizzazione o di ipomielinizzazione.

Sono state riscontrate alterazioni a carico dei mitocondri che si presentano di aspetto rigonfio e con appiattimento delle creste ma l'aspetto che colpisce di più dal punto di vista di questi organelli è il loro aumento numerico (**Figura 27**).

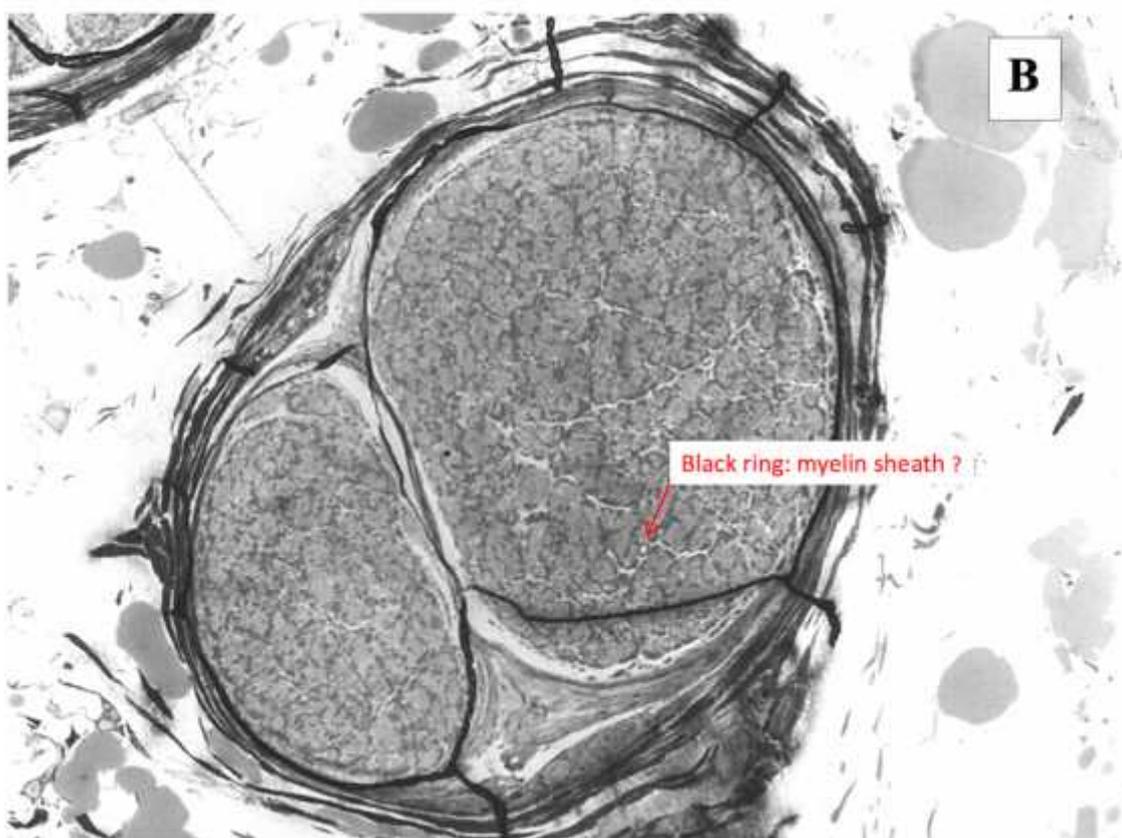
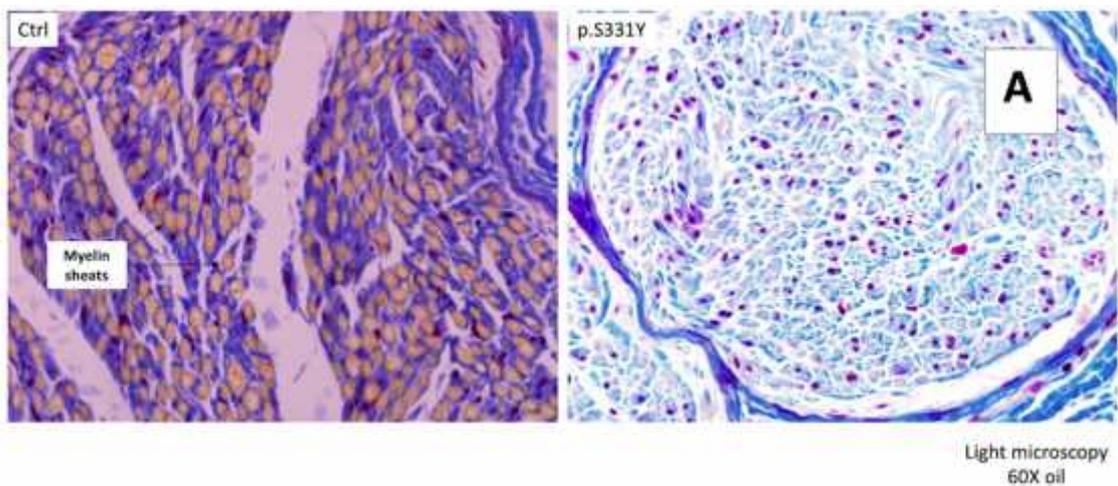


Figura 24 (A) Colorazione tricromica di Mallory, cross section **(B)** Microscopia elettronica. Il quadro neuropatologico è quello di una grave neuropatia con totale assenza di fibre mieliniche di piccolo e grosso calibro e severa ipertrofia connettivale (collagene). In B si nota la presenza di quella che forse è l'unica fibra mielinica nel preparato.

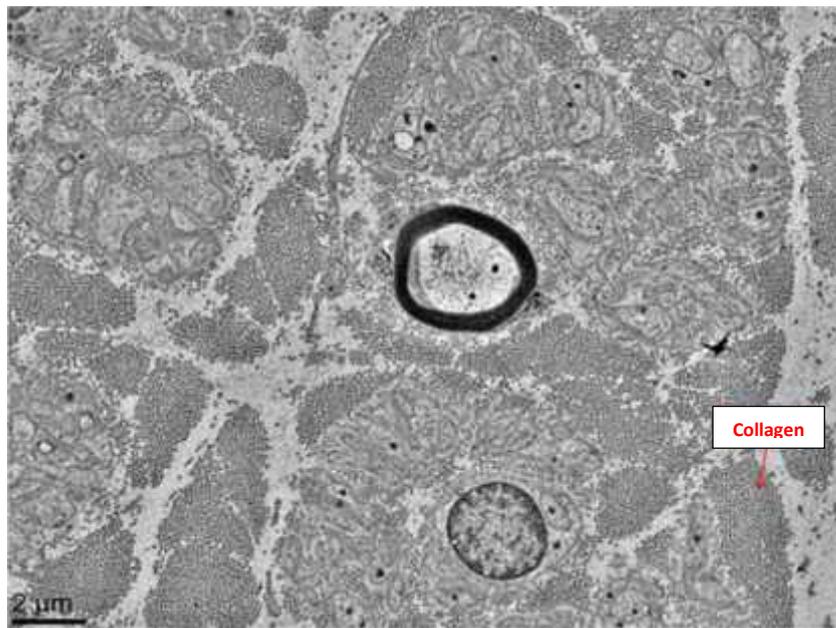


Figura 25 Viene messa in maggior evidenza l'unica fibra mielinica riscontrata nel preparato. Si apprezza con maggior chiarezza l'importante ipertrofia connettivale (collagene).

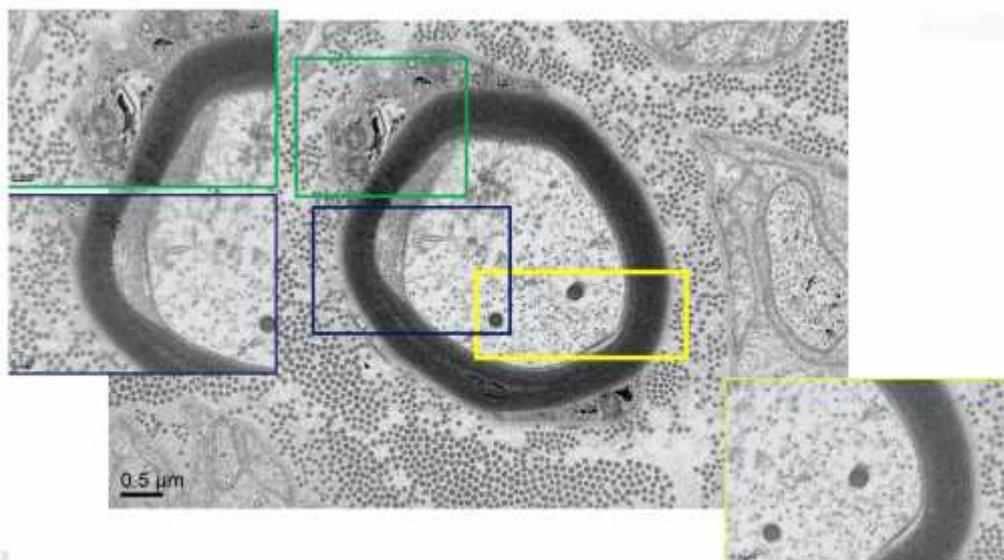


Figura 26 Ulteriore ingrandimento della fibra mielinica superstite che si presenta molto sofferente.

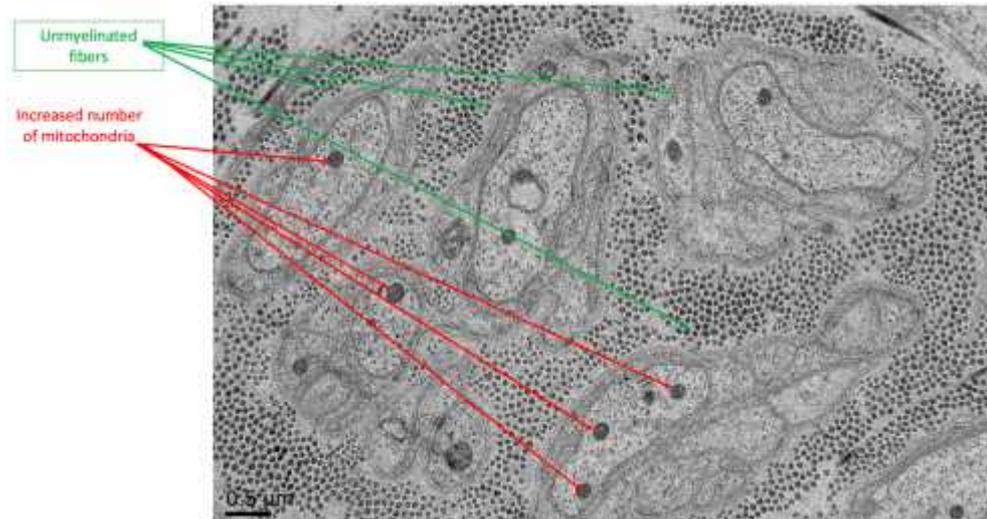


Figura 27 Questa figura permette di mettere in luce due aspetti: la relativa conservazione delle fibre amieliniche (segnalate in verde) e il notevole aumento numerico di mitocondri (segnalati in rosso), alcuni dei quali si presentano sofferenti.

BIOPSIA DI CUTE

Studio delle piccole fibre

L'analisi immunoistochimica in immunofluorescenza indiretta dei campioni biotici cutanei ha messo in evidenza in entrambe le pazienti quadri di importantissima denervazione epidermica. In particolare si osserva una completa assenza di fibre nervose di piccolo calibro, che fisiologicamente innervano questo strato cutaneo. Questo significa che, oltre al significativo coinvolgimento del SNP riscontrato all'elettro-neurografia, si ha anche un importante coinvolgimento delle piccole fibre epidermiche.

Quanto appena riportato è immediatamente evidente mettendo a confronto l'ENFD (Epidermal Nerve Fiber Density) in **figura 28 A**, propria di un controllo sano con l'ENFD in **figura 28 B**, propria della paziente 2. Mentre in **figura 28 A** vediamo una densità di fibre intraepidermiche (in verde) fisiologica, in **figura 28 B** si osserva una totale

denervezione intraepidermica ma anche un significativo impoverimento dell'innervazione del derma.

Nella paziente 1 si apprezza un quadro sovrapponibile (vedi **Figura 31**).

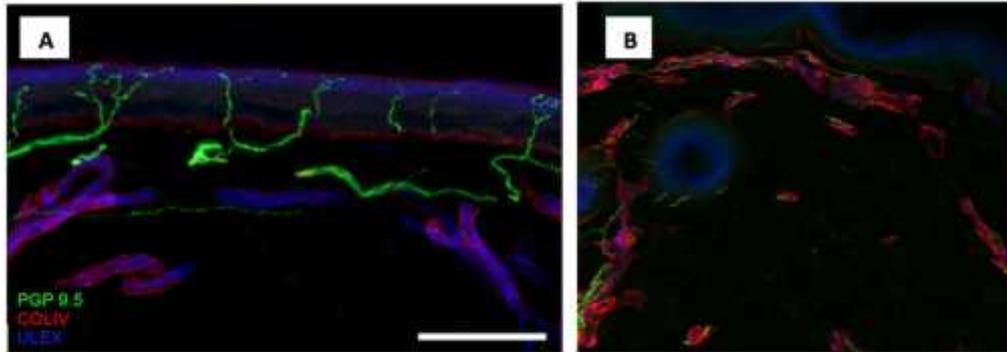


Figura 28 ENFD (Epidermal Nerve Fiber Density) in controllo sano (A) e in paziente 2 (B)

In entrambe le pazienti, con quadro maggiormente compromesso nella paziente 2, si mette in evidenza anche una notevole riduzione dell'innervazione sudorimotoria. In **figura 29 A** vediamo la ghiandola sudoripara di un controllo sano a confronto con quella della paziente 2, in **figura 29 B**. Nonostante la severa denervazione della ghiandola che si può osservare nella nostra paziente rispetto alla ghiandola del controllo sano, segnaliamo la presenza di un discreto numero di fibre sudorimotorie. Tuttavia le fibre superstiti sono morfologicamente alterate presentando rigonfiamenti e frammentazioni lungo le loro lunghezze.

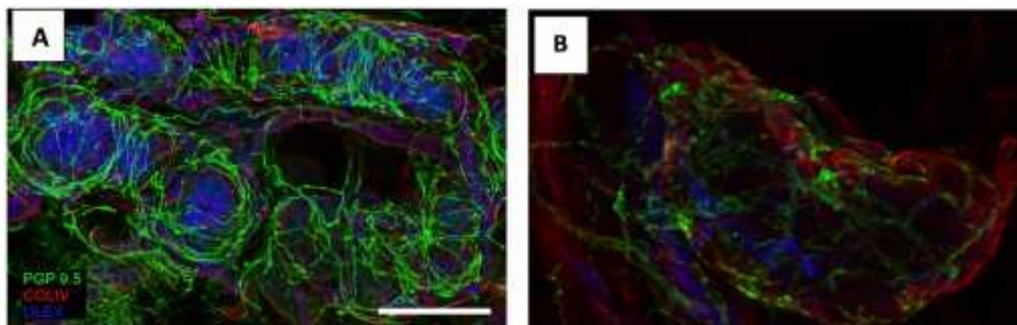


Figura 29 Ghiandola sudoripara in controllo sano (A) e in paziente 2 (B)

In entrambe le pazienti, con quadro maggiormente compromesso nella paziente 2, si descrive inoltre un'importante denervazione del follicolo pilifero, in particolare del muscolo erettore del pelo. Fisiologicamente il muscolo erettore del pelo è riccamente innervato da fibre nervose pilomotorie prevalentemente noradrenergiche, ma anche colinergiche, che decorrono tra le fibre muscolari e a queste parallele.

In **figura 30 A** (controllo sano) vediamo un muscolo erettore del pelo riccamente innervato mentre in **figura 30 B** (paziente 2) possiamo osservare che il muscolo piloerettore presenta una notevole denervazione anche se qualche fibra nervosa è ancora visibile.

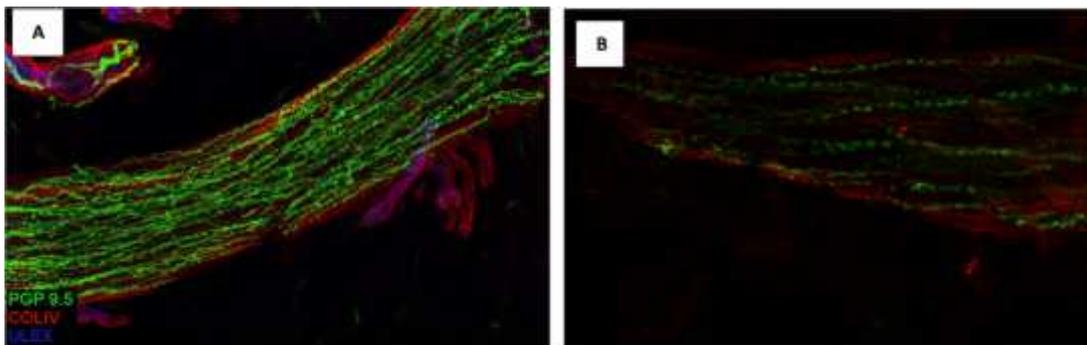


Figura 30 Muscolo erettore del pelo in controllo sano (**A**) e in paziente 2 (**B**)

Per la trattazione sono state prese in considerazione le immagini riferite alla paziente 2, perché di maggior impatto visivo. Le immagini riferite alla paziente 1 possono essere osservate nel pannello sottostante (**Figura 31**).

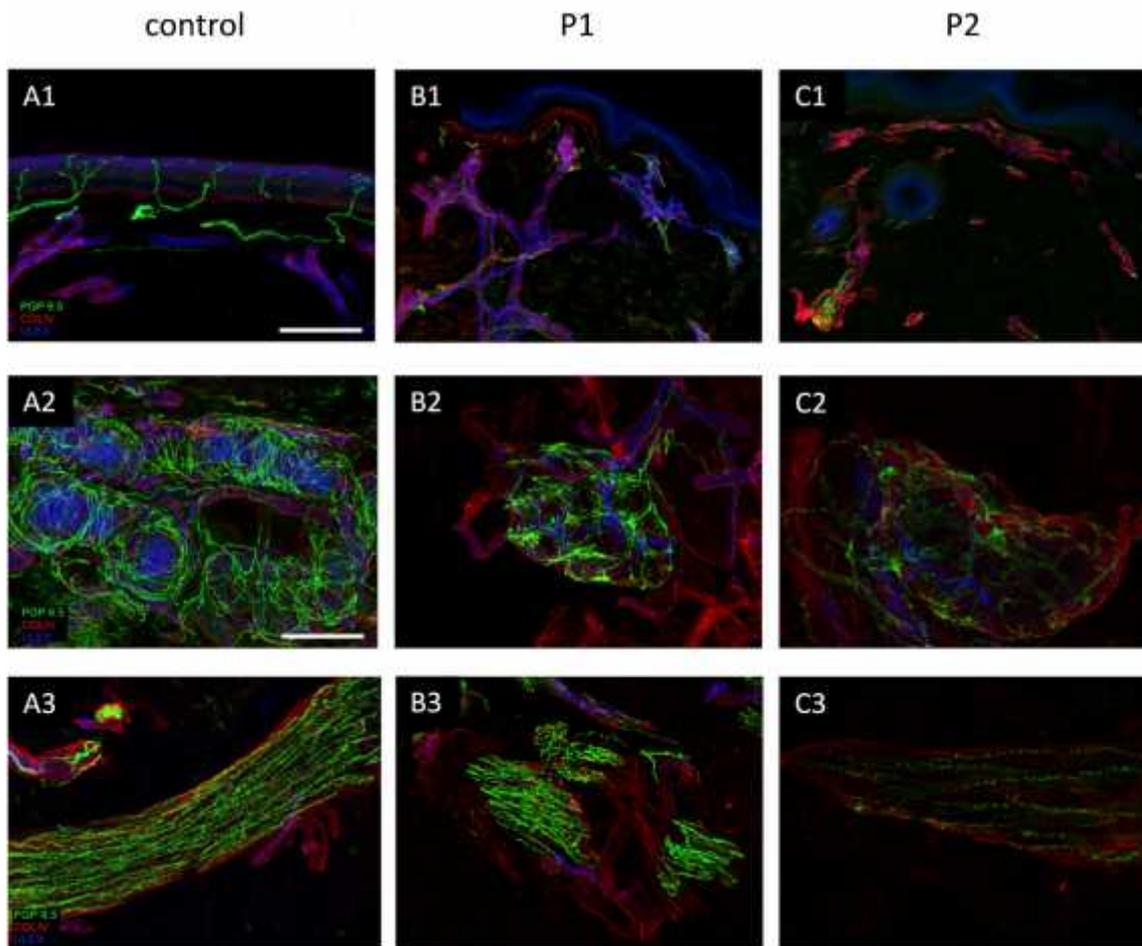


Figura 31 Pannello di confronto riassuntivo tra controllo sano (colonna 1: A), paziente 1 (colonna 2: B) e paziente 2 (colonna 3: C).

1: l'ENFD (Epidermal Nerve Fiber Density)

2: ghiandola sudoripara

3: Muscolo erettore del pelo

Studio su fibroblasti

Lo studio su fibroblasti primari delle pazienti, ottenuti prima dell'inizio della supplementazione, ha messo in evidenza un significativo aumento dei livelli di deossi-sfingolipidi tossici al loro interno, sebbene proporzionalmente inferiore rispetto all'aumento dei livelli degli stessi nel siero.

Sulle stesse colture di fibroblasti sono stati avviati studi riguardo l'efficacia in vitro della supplementazione di L-serina, di cui, ad oggi, abbiamo solo risultati preliminari.

I fibroblasti sono stati trattati con L-serina e, in un secondo tempo, sono stati dosati nuovamente i livelli sia degli sfingolipidi canonici e sia soprattutto dei deossisfingolipidi. I primi dati sembrano mettere in evidenza una riduzione dei livelli di 1-deossisfingolipidi e un aumento della concentrazione degli sfingolipidi canonici C20 nelle cellule delle pazienti.

Capitolo 5: Discussione e conclusioni

In questo elaborato descriviamo e caratterizziamo in dettaglio dal punto di vista clinico, neurofisiologico, biochimico e istopatologico due pazienti pediatriche italiane affette da HSAN-IA, portatici di mutazioni a carico del codone S331, nell'ottica di dare un contributo alla caratterizzazione della peculiare "S331 syndrome".

Vista l'estrema rarità di queste specifiche mutazioni è stata colta la preziosa opportunità di fare un confronto tra le nostre due pazienti e i soli altri cinque casi pediatrici portatori di mutazione S331, ad oggi descritti in letteratura.

Negli ultimi anni, diverse linee di evidenza hanno suggerito che le mutazioni di SPTLC1 che interessano il codone S331 sono associate ad un quadro clinico caratterizzato da esordio precoce e fenotipo particolarmente severo e complesso.

Nel 2009 Rotthier [17] ha descritto per la prima volta un paziente francese portatore della mutazione **p.S331F** che, contrariamente ai pazienti HSAN-1A precedentemente riportati, mostrava un fenotipo più grave caratterizzato da esordio congenito con ritardo della crescita e ritardo mentale, ipotonia e paralisi delle corde vocali. In uno studio successivo, Rotthier, ha riportato il caso di un altro paziente HSAN portatore della mutazione p.S331F, già descritto da Huehne nel 2008 [16]. Anche in questo paziente, di origine tedesca, i primi sintomi di malattia si sono manifestati molto precocemente ma non alla nascita come nel paziente di Rotthier. Il paziente ha manifestato una neuropatia sensoriale e autonoma con ipo-anestesia termodolorifica e anidrosi, progressivo coinvolgimento motorio e cataratta giovanile.

In letteratura è stato poi descritto da Suh nel 2014 [19] un paziente con esordio nei primi anni di vita caratterizzato da una neuropatia sensitiva e motoria con amiotrofia globale, paralisi delle corde vocali, scoliosi e cataratta.

La nostra paziente con mutazione p.S331F (paziente 2) ha mostrato un esordio infantile di malattia con ritardo nell'acquisizione delle tappe motorie, impaccio motorio globale e sintomatologia gastrointestinale (reflusso gastro-esofageo, sazietà precoce, rallentato svuotamento gastrico, nausea frequente). Nei primi anni di vita le è stata diagnosticata la cataratta, probabilmente secondaria a una grave riduzione della lacrimazione. La sintomatologia gastrointestinale e la compromissione della lacrimazione possono essere correlati a una disfunzione del sistema nervoso autonomo, confermata dai più recenti reperti anamnestici di ridotta sudorazione. Le prestazioni motorie sono ancora conservate, nonostante l'ipotonia diffusa e le modeste deformità a carico dei piedi. Anche i risultati della risonanza magnetica muscolare sono indicativi di un lieve coinvolgimento muscolare. Viceversa gli studi di conduzione nervosa hanno messo in evidenza il coinvolgimento dei nervi motori (oltre ai nervi sensitivi) all'interno del quadro della neuropatia. Gli studi della densità delle piccole fibre su biopsia di cute hanno confermato il coinvolgimento sensitivo e autonomo, nonostante il primo sia molto più grave del secondo.

Il quadro clinico di questa bambina è quindi abbastanza coerente con quelli descritti negli altri tre pazienti p.S331F.

I quattro quadri di malattia sono insorti tutti entro il quinto anno di vita e si caratterizzano per coinvolgimento sensitivo, autonomo e motorio con atrofia

muscolare diffusa e opacità del cristallino. Solo il paziente descritto da Suh sembra non presentare alterazioni disautonomiche.

La mutazione **p.S331Y** è stata descritta per la prima volta in una paziente da Auer-Grumbach et al. nel 2013 [18] con storia di progressiva ipostenia e deperimento, grave scoliosi, deformità dei piedi, problemi respiratori, cataratta giovanile e dipendenza dalla sedia a rotelle raggiunta all'età di 14 anni. Riflessi vivaci e fascicolazioni linguali avevano inizialmente suggerito una diagnosi di neuropatia ereditaria motoria e sensitiva (HMSN). È stato recentemente segnalato da Rossi et al. [20] un secondo paziente dello Sri Lanka, che condivide la maggior parte delle caratteristiche cliniche principali della sindrome S331, inclusa l'insorgenza precoce di ipotrofia muscolare diffusa, ipostenia progressiva, deformità dei piedi e cataratta. Questo paziente presenta anche riflessi tendinei vivaci, fascicolazioni linguali e disturbi gastrointestinali. Sebbene le NCV di entrambi i pazienti p.S331Y abbiano rivelato un coinvolgimento significativo sia dei nervi sensitivi sia di quelli motori, nel paziente descritto da Rossi non sono stati riportati ipoestesia o sintomi sensitivi positivi significativi.

La nostra paziente p.S331Y, ha avuto esordio della patologia con disturbi sensitivi sottostimati, inclusi dolore e disestesie al tatto e un impaccio motorio globale.

Analogamente agli altri due pazienti p.S331Y, presenta vivaci riflessi osteotendinei e fascicolazioni linguali, non riportati nei pazienti p.S331F e che quindi possono essere considerati tipici della variante p.S331Y.

È interessante notare come la nostra paziente non mostri particolari sintomi di coinvolgimento autonomico né cataratta. Il quadro della paziente è però caratterizzato anche da scoliosi, problemi respiratori e soprattutto un grave coinvolgimento motorio

con perdita della deambulazione autonoma. La risonanza magnetica muscolare degli arti inferiori ha evidenziato una severa e diffusa involuzione adiposa dei muscoli della gamba e della coscia, più evidente a livello delle porzioni distali.

Il quadro clinico della paziente 1 è quindi abbastanza coerente con quello degli altri due pazienti p.S331Y. L'età all'ultima valutazione è 14 anni per tutti i tre pazienti; questo permette di confrontare con maggior efficacia i quadri di sviluppo della patologia in questi bambini. La caratteristica peculiare di tutti e tre questi pazienti è il prevalente coinvolgimento motorio con atrofia muscolare diffusa e impossibilità alla deambulazione autonoma. In tutti i pazienti la concomitante presenza di deformità del piede contribuisce alla difficoltà nella deambulazione. La scoliosi e le fascicolazioni linguali sono tratti comuni a tutti i pazienti.

Sia la nostra paziente sia quella segnalata da Auer-Grumbach et al. presentano compromissione della sensibilità termodolorifica ma, contrariamente al paziente descritto da Rossi, non presentano evidenti segni o sintomi di coinvolgimento autonomo. Quindi possiamo affermare che il quadro di queste due ragazze assomigli molto al fenotipo HMSN. Il questionario COMPASS331 somministrato alla paziente 1 ha tuttavia messo in luce un lieve e subdolo coinvolgimento del SNA per quanto riguarda la componente vasomotoria, gastrointestinale e pupillomotoria.

	Auer-Girumbach et al., 2013	Rossi et al., 2020	P1	Huetme et al., 2008	Roethlis et al 2009	Suh et al., 2014	P2
Mutazione	p.5331Y	p.5331Y	p.5331Y	p.5331F	p.5331F	p.5331F	p.5331F
Origine	NM	Sri Lanka	Italia	Germania	Francia (pisy)	Corea	Italia
Sexo	Femmina	Maschio	Femmina	Maschio	NM	Maschio	Femmina
Età all'insorgenza	4 anni	4 anni	Prima infanzia	Prima infanzia	Congenita	5 anni	Prima infanzia
Età all'ultima valutazione	14 anni	14 anni	14 anni	NM	7 anni	28 anni	6 anni
Coinvolgimento sensitivo	SI	No	SI	SI	SI	SI	SI
Ulcere plantari/ amputazioni	SI	No	No	SI	SI	SI	No
Atrofia muscolare diffusa	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
Coinvolgimento motorio	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
Dipendenza da sedia a rotelle	SI (14 anni)	SI (8 anni)	SI (10 anni)	No	No	No (dipendenza da ginelio dai 27 anni di età)	No
Coinvolgimento SMA	No	Sintomi di coinvolgimento gastrointestinale	No	Alterata tolleranza al calore e auditivi	Reflusso gastroesofageo	No	Ritardato svuotamento gastrico, sazietà precoce, eruttazioni, nausea e vomito
Caceratta giovanile	SI	SI	No	SI (7)	SI	SI	SI
Piede cavo/deformità dei piedi	SI	SI	SI	NM	No	NM	SI
Scalini	SI	SI	SI	NM	NM	SI	No
Paralisi delle corde vocali/raucedine	NM	NM	SI	NM	SI	SI	No
Fascicolazioni linguali	SI	SI	SI	NM	NM	NM	No
Problemi respiratori	SI	SI	SI	NM	SI	SI	No
Ritardo della crescita	SI	SI	No	NM	NM	NM	SI
Ritardo mentale	No	No	No	No	SI	NM	No
CMT/PeDS	-	-	35/44	-	-	-	18/44
Dosaggio sfilipolipi su siero	-	-	-	-	-	-	-
	↑ livelli di 1-deossyl.	↑ livelli di 1-deossyl.	↑ livelli di 1-deossyl.	↑ livelli di 1-deossyl.	↑ livelli di 1-deossyl.	↑ livelli di 1-deossyl.	↑ livelli di 1-deossyl.
Studi di conduzione nervosa	SM assonale	Mista demielinizante e assonale	Mista demielinizante e assonale AASS e AAI Assente risposta sensitiva AAI)	SM Assonale	SM Risposta assonale AASS e AAI	Mista demielinizante e assonale AASS Risposta assonale AAI)	SM Mista demielinizante e assonale Assente risposta sensitiva AAI
Biopsia di nervo	-	-	Marcata perdita di fibre mieliche e relativa conservazione fibre amieliniche	Marcata perdita di fibre mieliche; segni di danno assonale; presenza di fibre amieliniche	-	-	-
Densità delle piccole fibre su biopsia di cute	-	-	Severa denervazione epidermica	-	-	-	Severa denervazione epidermica
RM muscolare	-	-	SI	-	-	-	SI

Tabella 10 Tabella confronto casi S331

Pertanto, sulla base di queste osservazioni, suggeriamo che le mutazioni S331 non si associno necessariamente a una sindrome distinta, ma che piuttosto possano causare un fenotipo più grave, a esordio precoce e che potremmo definire misto HSAN/HMSN. In particolare, il quadro clinico dei pazienti p.S331Y sembra essere caratterizzato da una neuropatia motoria più rapidamente progressiva, priva di un significativo coinvolgimento autonomico, più spiccato invece nei pazienti p.S331F. La compromissione sensitiva, sebbene spesso non clinicamente significativa, è evidente in tutti i 7 pazienti agli studi di conduzione nervosa e, nelle nostre pazienti, allo studio delle piccole fibre su biopsia di cute.

Sembra infatti che lo studio delle piccole fibre su biopsia di cute non sia mai stato condotto e descritto negli altri pazienti con mutazione S331. La densità delle piccole fibre epidermiche è stata utilizzata come una delle misure di outcome del trial clinico sulla supplementazione con L-serina in pazienti adulti con mutazione aspecifica a carico di SPTLC1, senza tuttavia fornire dettagli sullo stato di innervazione intraepidermica dei pazienti.

In entrambe le nostre pazienti la **biopsia di cute per lo studio delle piccole fibre** ha messo in evidenza che sia l'innervazione cutanea somatica (sensitiva) sia quella autonoma sono compromesse. Tuttavia il gravissimo coinvolgimento della componente somatica è molto più severo rispetto a quello della componente autonoma, diversamente da quanto invece si osserva in neuropatie autonome propriamente dette (es. HSAN-IV).

Un aspetto interessante da segnalare è che nella paziente 1 il prelievo bioptico è stato eseguito, per necessità contingenti, prossimalmente, a livello della coscia mentre nella paziente 2 è stato eseguito a livello del polpaccio, sede segnalata in letteratura come maggiormente informativa. Il prelievo bioptico per lo studio delle IENF (Intraepidermal Nerve Fibers) può essere eseguito in qualsiasi sito corporeo ma bisogna tenere in considerazione la maggiore densità delle piccole fibre nelle sedi prossimali. Fisiologicamente, ENFD alla gamba distale è circa il 60% di quella alla coscia [58]. La valutazione e l'eventuale confronto dei riscontri bioptici delle due pazienti deve quindi necessariamente tenere in considerazione la presenza di questo gradiente disto-proximale. La paziente 1, pur soffrendo di un grave quadro di denervazione epiteliale, presenta un coinvolgimento dell'innervazione sudorimotoria e pilomotoria di minor gravità rispetto alla paziente 2. Questo dato potrebbe essere sia secondario a un minor grado di compromissione autonoma della paziente 1 sia al gradiente disto-proximale del prelievo.

Per quanto riguarda la **biopsia di nervo**, ad oggi in letteratura sono riportati solo i dati relativi a un paziente HSAN-IA con mutazione a carico del codone S331 (p.S331F). Huehne et al. hanno descritto marcata perdita di fibre mieliniche, segni di danno assonale e sostanziale conservazione delle fibre amieliniche. [16]

La mancanza di ulteriori dati è secondaria all'estrema rarità delle mutazioni a carico di questo codone e al carattere invasivo della procedura, ad oggi non necessaria per la diagnosi di patologia.

Nell'ottica di fornire ulteriori elementi alla caratterizzazione istopatologica della nostra paziente, e più in generale dei pazienti S331, è stata colta l'occasione dell'intervento ortopedico eseguito nel novembre 2020 per sottoporre la paziente 1, portatrice della mutazione p.S331Y, a biopsia di nervo surale.

Il quadro neuropatologico osservato è quello di una grave neuropatia caratterizzata da pressoché totale assenza di fibre mieliniche, relativa conservazione di fibre amieliniche, importante ipertrofia connettivale e un aumento del numero dei mitocondri.

Il quadro osservato nella nostra paziente è quindi sostanzialmente sovrapponibile sia con quello descritto nel paziente p.S331F da Huehne sia con quelli descritti nei 6 pazienti affetti da forma classica di HSAN-IA associata alla mutazione p.C133W pubblicati da Houlden nel 2006 [46].

Dal punto di vista biochimico, in occasione della visita di screening, è stato eseguito il profilo lipidomico di entrambe le pazienti. È stato riscontrato un aumento dei livelli sierici delle basi sfingoidi canoniche C20 e dei deossi-sfingolipidi (1-deossiSL e 1-deossimetilSL).

Questi dati sono coerenti con quanto descritto in letteratura da Bode et al. in un lavoro in cui è stato dimostrato proprio uno specifico aumento di basi sfingoidi canoniche C20 in pazienti S331F/Y, secondario ad un aumento dell'attività del complesso enzimatico SPT, oltre all'aumento dei livelli di deossi-sfingolipidi tipico dei pazienti HSAN-I. [29]

Vera Fridman e il suo gruppo di ricerca hanno usato il dosaggio - e in particolare la riduzione - dei livelli di questi lipidi neurotossici come una delle principali misure di outcome di un trial terapeutico che ha dimostrato la potenziale efficacia della supplementazione di L-serina nel rallentare la progressione della malattia in pazienti adulti HSAN-I. In questo studio, i livelli di 1-deossiSLs nei pazienti trattati hanno raggiunto livelli vicini ai valori fisiologici dopo 24 settimane dall'inizio del trattamento per poi mostrare ancora una progressiva, seppur più lenta, riduzione nei mesi successivi. Non sono state segnalate alterazioni significative dei livelli degli sfingolipidi tipici. Sulla base dei loro riscontri, Vera Fridman et al. hanno ipotizzato che il potenziale effetto della supplementazione osservato sia una conseguenza della soppressione dei livelli di 1-deossisfingolipidi [42].

Sulla base dei risultati di questo studio e del riscontro di livelli sierici aumentati di 1-deossisfingolipidi nelle nostre due pazienti in occasione della visita di screening, è stata avviata la **supplementazione orale con L-serina**.

Al termine del trial, programmato ad 1 anno dall'inizio della terapia, verranno dosati nuovamente basi sfingoidi canoniche C20 e 1-deossi-sfingolipidi per poter fare considerazioni riguardo l'efficacia della terapia sulla riduzione di questi sfingolipidi neurotossici nel siero di pazienti S331 pediatrici.

Ad oggi, la paziente 1 è stata trattata e seguita in follow-up per 10 mesi mentre la paziente 2 per 5 mesi.

Dopo i 10 mesi di terapia la paziente 1 non ha mostrato segni di miglioramento clinico né miglioramenti significativi alle valutazioni funzionali (CMTPedS), ma al contrario, un

aggravamento passando da un punteggio al T0 di 33/44 a un punteggio di 35/44 all'ultima valutazione.

Dopo i 5 mesi di terapia nella paziente 2 si sono osservati invece lievi miglioramenti alla CMTPedS in particolare nelle prove di valutazione dell'equilibrio e nelle prove di forza. Si è passati da uno score di 24/44 al T0 a uno score di 18/44 in occasione dell'ultima valutazione. Non possiamo escludere che i lievi miglioramenti riscontrati di valutazione in valutazione siano da attribuire alla crescita della bambina e alla conseguente sempre maggiore compliance nell'esecuzione delle consegne, ma neanche che siano dovuti a iniziali effetti benefici della supplementazione.

Bisogna tuttavia considerare che nello studio di Fridman et al. sono stati rilevati i primi significativi miglioramenti alla CMTPedS dopo 1 anno di trattamento, poi sempre più evidenti durante il secondo anno. I nostri sono solo risultati iniziali e sarà necessario continuare le valutazioni in follow-up per avere risultati più solidi riguardo l'eventuale efficacia clinica della supplementazione.

Un'altra valutazione che viene eseguita ad ogni visita di controllo in entrambe le pazienti è la risposta simpatico cutanea, test che indaga, in maniera non invasiva, lo stato di compromissione del SNA nella sua componente sudomotoria.

Per quanto riguarda la paziente 1, il dato che possiamo ricavare dai risultati di quattro valutazioni, la prima delle quali eseguita al T0 e l'ultima a 10 mesi dall'inizio della supplementazione, è quello di un lieve e progressivo peggioramento del quadro soprattutto a livello del piede dove si è verificata una riduzione della risposta fino alla sua scomparsa. È stato invece riscontrato un quadro di sostanziale stabilità a livello della mano.

Per quanto riguarda invece la paziente 2, nel corso dei 5 mesi di terapia si può osservare un lieve miglioramento dei valori di ampiezza dei potenziali.

I dati riguardo le due pazienti sono ad oggi contrastanti. Tuttavia la risposta simpatico cutanea è un esame di non facile esecuzione per la possibile interferenza di stimoli ambientali disturbanti e, inoltre, si tratta di un esame la cui rilevanza è ancora in discussione nell'ambito dell'inquadramento del coinvolgimento del sistema nervoso autonomo.

I risultati finali del trial terapeutico purtroppo non sono ancora disponibili. Sulla base dei dati raccolti possiamo dire che nella paziente 1 (p.S331Y) la supplementazione ad oggi non ha dato i risultati incoraggianti in ambito clinico che invece si sono osservati nella paziente 2 (p.S331F) dopo soli 5 mesi di terapia.

Per poter arrivare a solide conclusioni riguardo l'effettiva efficacia della supplementazione è necessario continuare le valutazioni cliniche e aspettare i risultati dei dosaggi sierici degli sfingolipidi e dello studio della densità delle piccole fibre su biopsia di cute a 12 mesi dall'inizio della supplementazione, alla ricerca di eventuali benefici biochimici e istopatologici della terapia.

Un altro aspetto di grande importanza è che nei primi mesi di trattamento le pazienti non hanno dimostrato nessun effetto collaterale e nessuno squilibrio significativo per quanto riguarda i dosaggi degli amminoacidi in plasma e urine.

Riguardo la potenziale efficacia e il potenziale beneficio della supplementazione di L-serina in pazienti HSAN-IA con mutazione a carico del codone S331, possiamo fare alcuni ragionamenti basati su un lavoro riguardo la struttura cristallografica del

complesso enzimatico SPT pubblicato a marzo 2021 [44]. Secondo questo studio, le mutazioni p.S331F e p.S331Y, per la loro collocazione sterica all'interno del complesso enzimatico, determinerebbero una "toxic gain of function" di SPT dovuta probabilmente ad una mancata fisiologica interazione con la proteina regolatoria ORMDL3 che ha un effetto inibitorio sull'attività di SPT e sembra avere il sito di legame in prossimità di queste mutazioni (vedi **Figura 6** – Capitolo 1).

La possibilità che mutazioni diverse di SPTLC1 possano dare effetti diversi sull'attività enzimatica era stata anche evidenziata nel lavoro di Bode [29] in cui sono state trasfettate cellule con le diverse mutazioni e poi studiate l'attività enzimatica di SPT e la produzione di sfingolipidi. Anche in questo setting sperimentale le mutazioni dell'aminoacido Ser331 sono state associate con un aumento dei C20.

Sulla base di queste ipotesi quindi non sarebbe utile supplementare questa specifica classe di pazienti con L-serina quanto piuttosto con altre molecole in grado di ridurre l'attività del complesso enzimatico iperattivato.

L'integrazione esogena di L-serina in pazienti S331, con attività SPT aumentata, potrebbe infatti portare non solo a una diminuzione benefica dei livelli di deossi-sfingolipidi tossici ma anche a un aumento dei livelli degli sfingolipidi canonici C20, che sono stati dimostrati responsabili di neurodegenerazione nel modello animale. [43].

Questa recentissima ipotesi ha reso ancora più preziosi gli studi, ancora in corso presso il National Institute of Health (NIH) di Bethesda, sui **fibroblasti** ottenuti da biopsia di cute delle nostre due pazienti S331, finalizzati alla valutazione degli effetti sul fenotipo cellulare della supplementazione in vitro di L-serina su cellule primarie di pazienti. I dati preliminari arrivati dall'NIH sembrano mettere in evidenza una riduzione dei livelli

intracellulari di 1-deossisfingolipidi e un aumento della concentrazione di sfingolipidi canonici C20, come atteso. Si tratta tuttavia di risultati preliminari derivanti da studi in vitro e che, pur essendo ottenuti su cellule primarie delle pazienti, non ci dicono nulla su cosa avviene in vivo a livello della componente anatomica di nostro interesse: il nervo e in particolare le fibre nervose.

Abbiamo quindi da una parte la grande opportunità terapeutica offerta a pazienti pediatrici HSAN-IA dalla supplementazione orale di L-serina che si è dimostrata potenzialmente efficace nel rallentare la progressione della malattia in pazienti adulti HSAN-IA, indipendentemente dalla specifica mutazione di SPTLC1, e dall'altra le recentissime evidenze sperimentali che incoraggiano nuovi studi, già in corso, sulla specifica mutazione S331 delle nostre due pazienti.

Bibliografia

- [1] Arthur K. Asbury, John D. England, «Peripheral neuropathy,» *The Lancet*, vol. 363, pp. 2151-2161, 2004.
- [2] Lan Zhou, «Small fiber neuropathy,» *Seminars in Neurology*, vol. 39, n. 5, pp. 570-577, 2019.
- [3] M. Nelaton, «Affection singuliere des os du pied» *Gaz Hop Civ Milit*, vol. 4, pp. 13-20, 1852.
- [4] P. J. Dyck et al. "Peripheral Neuropathy", 3rd Ed., Philadelphia: WB Saunders , 1993.
- [5] C. Schwartzlow & M. Kazamel, «Hereditary sensory and autonomic neuropathies: adding more to the classification,» *Current neurology and neuroscience reports*, vol. 19, n. 8, pp. 1-11, 2019.
- [6] Fazio-Loeb, *Neurologia Vol.2*, Società Editrice Universo, 2019.
- [7] E. P. Hicks, «Hereditary perforating ulcer of the foot» *The Lancet*, vol. 199, pp. 319-321, 1922.
- [8] D. E. Denny-Brown, «Hereditary sensory radicular neuropathy» *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 14, pp. 237-252, 1951.
- [9] A. J. Mandell & C. K. Smith «Hereditary sensory radicular neuropathy» *Neurology*, vol. 10, n. 7, pp. 627-627, 1960.
- [10] P. J. Dyck, A. J. Kennel, I. V. Magal & E. N. Kraybill «A Virginia kinship with hereditary sensory neuropathy: peroneal muscular atrophy and pes cavus» *Mayo Clinic Proceedings* , vol. 40, pp. 685-694, 1965.
- [11] A. M. G. Campbell & H. L. Hoffman «Sensory radicular neuropathy associated with muscle wasting in two cases» *Brain* , vol. 87, pp. 67-74, 1964.
- [12] G. A. De León, «Progressive ventral sensory loss in sensory radicular neuropathy and hypertrophic neuritis» *The Johns Hopkins medical journal*, vol. 125, n. 2, pp. 53-61, 1969.
- [13] G. Hageman, B. G. J. Hilhorst & A. R. Rozeboom «Is there involvement of the central nervous system in hereditary sensory radicular neuropathy?» *Clinical Neurology and Neurosurgery* , vol. 94, pp. 49-54, 1992.
- [14] G. A. Nicholson, J. L. Dawkins, I. P. Blair, M. L. Kennerson, M. J. Gordon, A. K. Cherryson, ... & T. Bananis «The gene for hereditary sensory neuropathy type I (HSN-1) maps to chromosome 9q22.1-q22.3» *Nature Genet.*, vol. 13, pp. 101-104, 1996.
- [15] O. Dubourg, C. Barhoumi, H. Azzedine, N. Birouk, A. Brice, P. Bouche & E. Leguern «Phenotypic and genetic study of a family with hereditary sensory neuropathy and prominent weakness» *Muscle & nerve*, vol. 23, n. 10, pp. 1508-1514, 2000.
- [16] K. Huehne, C. Zweier, K. Raab, S. Odent, M. Bonnaure-Mallet, J. L. Sixou, ... & B. Rautenstraus «Novel missense, insertion and deletion mutations in the neurotrophic tyrosine kinase

- receptor type 1 gene (NTRK1) associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis» *Neuromuscular Disorders* , vol. 18, pp. 159-166, 2008.
- [17] A. Rotthier, J. Baets, E. D. Vriendt, A. Jacobs, M. Auer-Grumbach, N. Lévy ... & V. Timmerman «Genes for hereditary sensory and autonomic neuropathies: a genotype-phenotype correlation» *Brain*, vol. 132, pp. 2699-2711, 2009.
- [18] M. Auer-Grumbach, H. Bode, T. R. Pieber, M. Schabhüttl, D. Fischer, R. Seidl, ... & T. Hornemann «Mutations at Ser331 in the HSN type I gene SPTLC1 are associated with a distinct syndromic phenotype» *European Journal of Medical Genetics*, vol. 56, pp. 266-269, 2013.
- [19] B. C. Suh, Y. B. Hong, K. Nakhro, S. H. Nam, K. W. Chung & B. O. Choi «Early-onset severe hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 with S331F SPTLC1 mutation» *Molecular Medicine Reports* , vol. 9, pp. 481-486, 2014.
- [20] F. Rossi, G. Bruno, M. Fratta, D. Colavito, S. Casertano, S. Sampaolo, ... & G. Puoti «Expanding the spectrum of SPTLC1-related disorders beyond hereditary sensory and autonomic neuropathies: A novel case of the distinct “S331 syndrome”» *Journal of the Peripheral Nervous System* , vol. 25, pp. 308-311, 2020.
- [21] I. P. Blair, J. L. Dawkins, & G. A. Nicholson «Fine mapping of the hereditary sensory neuropathy type I locus on chromosome 9q21.1-q22.3: exclusion of GAS1 and XPA» *Cytogenetics and Cell Genetics*, vol. 78, pp. 140-141, 1997.
- [22] I. P. Blair, D. Hulme, J. L. Dawkins & G. A. Nicholson «A YAC-based transcript map of human chromosome 9q22.1-q22.3 encompassing the loci for hereditary sensory neuropathy type I and multiple self-healing squamous epithelioma» *Genomics* , vol. 51, pp. 277-281, 1998.
- [23] K. Bejaoui, D. McKenna-Yasek, B. A. Hosler, E. Burns-Deater, L. M. Deater, G. O’Neill ...& R.H. Brown «Confirmation of linkage of type 1 hereditary sensory neuropathy to human chromosome 9q22» *American Academy of Neurology* , vol. 52, pp. 510-515, 1999.
- [24] J. L. Dawkins, D. J. Hulme, S. B. Brahmabhatt, M. Auer-Grumbach, & G. A. Nicholson «Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I» *Nature Genetics* , vol. 27, pp. 309-312, 2001.
- [25] K. Bejaoui, C. Wu, M. D. Scheffler, G. Haan, P. Ashby, L. Wu ... & R. H. Brown Jr «SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1» *Nature Genetics* , vol. 27, pp. 261-262, 2001.
- [26] K. Verhoeven, K. Coen, E. De Vriendt, A. Jacobs, V. Van Gerwen, I. Smouts ... & P. De Jonghe «SPTLC1 mutation in twin sisters with hereditary sensory neuropathy type I» *Neurology*, vol. 62, pp. 1001-1002, 2004.
- [27] T. Hornemann, A. Penno, S. Richard, G. Nicholson, F. S. Van Dijk, A. Rotthier ... & A. Von Eckardstein «A systematic comparison of all mutations in hereditary sensory neuropathy type I (HSAN I) reveals that the G387A mutation is not disease associated» *Neurogenetics* , vol. 10, pp. 135-143, 2009.
- [28] B. Rautenstrauss, B. Neitzel, C. Muench, J. Haas, E. Holinski-Feder & A. Abicht «Late onset hereditary sensory neuropathy type 1 (Hsn1) caused by a novel P. C133r missense mutation in Sptlc1» *Journal of the Peripheral Nervous System*, vol. 14, pp. 124-125, 2009.
- [29]

- H. Bode, F. Bourquin, S. Suriyanarayanan, Y. Wei, I. Alecu, A. Othman... & T. Hornemann «HSAN1 mutations in serine palmitoyltransferase reveal a close structure–function–phenotype relationship» *Human molecular genetics*, vol. 25, n. 5, pp. 853-865, 2016.
- [30] B. Weiss & W. Stoffel «Human and Murine Serine-Palmitoyl-CoA Transferase: Cloning, Expression and Characterization of the Key Enzyme in Sphingolipid Synthesis» *European journal of biochemistry*, vol. 249, n. 1, pp. 239-247, 1997.
- [31] A. Penno, M. M. Reilly, H. Houlden, M. Laurá, K. Rentsch, V. Niederkofler ... & T. Hornemann «Hereditary sensory neuropathy type 1 is caused by the accumulation of two neurotoxic sphingolipids» *Journal of Biological Chemistry* , vol. 285, n. 15, pp. 11178-11187, 2010.
- [32] T. Hornemann, S. Richard, M. F. Rütli, Y. Wei & A. von Eckardstein «Cloning and initial characterization of a new subunit for mammalian serine-palmitoyltransferase» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, n. 49, pp. 37275-37281, 2006.
- [33] G. Han, S. D. Gupta, K. Gable, S. Niranjankumari, P. Moitra, F. Eichler ... & T. M. Dunn «Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n. 20, pp. 8186-8191, 2009.
- [34] D. K. Perry, J. Carton, A. K. Shah, F. Meredith, D. J. Uhlinger & Y. A. Hannun «Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis» *Journal of Biological Chemistry* , vol. 275, pp. 9078-9084, 2000.
- [35] T. Herget, C. Esdar, S. A. Oehrlein, M. Heinrich, S. Schütze, A. Maelicke & G. van Echten-Deckert «Production of ceramides causes apoptosis during early neural differentiation in vitro» *Journal of Biological Chemistry* , vol. 275, pp. 30344-30354, 2000.
- [36] K. Bejaoui, Y. Uchida, S. Yasuda, M. Ho, M. Nishijima, R. H. Brown ... & K. Hanada «Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis» *The Journal of Clinical Investigation* , vol. 110, n. 9, pp. 1301-1308, 2002.
- [37] V.N. Dedov, I. V. Dedova, A. H. Merrill Jr & G. A. Nicholson «Activity of partially inhibited serine palmitoyltransferase is sufficient for normal sphingolipid metabolism and viability of HSN1 patient cells» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, vol. 1688, n. 2, pp. 168-175, 2004.
- [38] A. McCampbell, D. Truong, D. C. Broom, A. Allchorne, K. Gable, R. G. Cutler ... & R. H. Brown Jr «Mutant SPTLC1 dominantly inhibits serine palmitoyltransferase activity in vivo and confers an age-dependent neuropathy» *Human molecular genetics*, vol. 14, n. 22, pp. 3507-3521, 2005.
- [39] F. S. Eichler, T. Hornemann, A. McCampbell, D. Kuljis, A. Penno, D. Vardeh...& R. H. Brown Jr «Overexpression of the wild-type SPT1 subunit lowers desoxysphingolipid levels and rescues the phenotype of HSAN1» *Journal of neuroscience*, vol. 29, n. 46, pp. 14646-14651, 2009.
- [40] P. Schöffski, H. Dumez, R. Ruijter, B. Miguel-Lillo, A. Soto-Matos, V. Alfaro & G. Giaccone «Spisulosine (ES-285) given as a weekly three-hour intravenous infusion: results of a phase I dose-escalating study in patients with advanced solid malignancies» *Cancer chemotherapy*

- and pharmacology, vol. 68, n. 6, pp. 1397-1403, 2011.
- [41] E. Vilar, V. Grünwald, P. Schöffski, H. Singer, R. Salazar, J. L. Iglesias... & J. Tabernero «A phase I dose-escalating study of ES-285, a marine sphingolipid-derived compound, with repeat dose administration in patients with advanced solid tumors» *Investigational new drugs*, vol. 30, n. 1, pp. 299-305, 2012.
- [42] V. Fridman, S. Suriyanarayanan, P. Novak, W. David, E. A. Macklin, D. McKenna-Yasek... & F. Eichler «Randomized trial of l-serine in patients with hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1» *Neurology*, vol. 92, n. 4, pp. e359-e370, 2019.
- [43] L. Zhao, S. Spassieva, K. Gable, S. D. Gupta, L. Y. Shi, J. Wang, ... & P. M. Nishina «Elevation of 20-carbon long chain bases due to a mutation in serine palmitoyltransferase small subunit b results in neurodegeneration» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, n. 42, pp. 12962-12967, 2015.
- [44] Y. Wang, Y. Niu, Z. Zhang, K. Gable, S. D. Gupta, N. Somashekarappa... & C. H. Lee «Structural insights into the regulation of human serine palmitoyltransferase complexes» *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 28, n. 3, pp. 240-248, 2021
- [45] M. L. Gantner, K. Eade, M. Wallace, M. K. Handzlik, R. Fallon, J. Trombley... & M. Friedlander «Serine and lipid metabolism in macular disease and peripheral neuropathy» *The New England Journal of Medicine*, vol. 381, pp. 1422-1433, 2019.
- [46] H. Houlden, R. King, J. Blake, M. Groves, S. Love, C. Woodward... & M. M. Reilly «Clinical, pathological and genetic characterization of hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 (HSAN I)» *Brain*, vol. 129, n. 2, pp. 411-425, 2006.
- [47] J. D. England, G. S. Gronseth, G. Franklin, G. T. Carter, L. J. Kinsella, J. A. Cohen... & American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation «Evaluation of distal symmetric polyneuropathy: the role of autonomic testing, nerve biopsy, and skin biopsy (an evidence-based review)» *Muscle & nerve*, vol. 39, n. 1, pp. 106-115, 2009.
- [48] G. Lauria, D. R. Cornblath, O. Johansson, J. C. McArthur, S. I. Mellgren, M. Nolano... & C. Sommer «EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy» *European journal of neurology*, vol. 12, n. 10, pp. 747-758, 2005.
- [49] V. Fridman, A. L. Oaklander, W. S. David, E. A. Johnson, J. Pan, P. Novak... & F. S. Eichler «Natural history and biomarkers in hereditary sensory neuropathy type 1» *Muscle & nerve*, vol. 51, n. 4, pp. 489-495, 2015.
- [50] G. Solders, T. Andersson & A. Persson «Central conduction and autonomic nervous function in HMSN I» *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, vol. 14, n. 11, pp. 1074-1079, 1991.
- [51] D. M. Sletten, G. A. Suarez, P. A. Low, J. Mandrekar & W. Singer «COMPASS 31: a refined and abbreviated Composite Autonomic Symptom Score» *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 87, n. 12, pp. 1196-1201, 2012.

- [52] T. J. De Koning «Treatment with amino acids in serine deficiency disorders» *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 29, n. 2-3, pp. 347-351, 2006.
- [53] K. Garofalo, A. Penno, B. P. Schmidt, H. J. Lee, M. P. Frosch, A. von Eckardstein... & F. S. Eichler «Oral L-serine supplementation reduces production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1» *The Journal of clinical investigation*, vol. 121, n. 12, pp. 4735-4745, 2011.
- [54] J. Burns, R. Ouvrier, T. Estilow, R. Shy, M. Laurá, J. F. Pallant... & R. S. Finkel «Validation of the Charcot–Marie–Tooth disease pediatric scale as an outcome measure of disability» *Annals of neurology*, vol. 71, n. 5, pp. 642-652, 2012.
- [55] E. J. Vinik, R. P. Hayes, A. Oglesby, E. Bastyr, P. Barlow, S. L. Ford-Molvik & A. I. Vinik «The development and validation of the Norfolk QOL-DN, a new measure of patients' perception of the effects of diabetes and diabetic neuropathy» *Diabetes technology & therapeutics*, vol. 7, n. 3, pp. 497-508, 2005.
- [56] R. Vetrugno, R. Liguori, P. Cortelli & P. Montagna «Sympathetic skin response» *Clinical autonomic research*, vol. 13, n. 4, pp. 256-270, 2003.
- [57] D. Fischer, R. A. Kley, K. Strach, C. Meyer, T. Sommer, K. Eger... & M. Olive «Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies» *Neurology*, vol. 71, n. 10, pp. 758-765, 2008.
- [58] V. Provitera, C. H. Gibbons, G. Wendelschafer-Crabb, V. Donadio, D. F. Vitale, A. Stancanelli, ... & M. Nolano «A multi-center, multinational age-and gender-adjusted normative dataset for immunofluorescent intraepidermal nerve fiber density at the distal leg» *European journal of neurology*, vol. 23, n 2, pp. 333-338, 2016.