



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E
CHIRURGIA

Tesi di Laurea

**“The Nociceptive Evoked Potentials as a Marker of
Involvement of Small Nerve Fibers in CANVAS”**

Relatore

Chiar.mo Prof. Angelo Schenone

Correlatrice

Dott.ssa Sara Massucco

Candidata

Viola Bruzzone

Matricola n. 4481313

Anno Accademico 2023/2024

Ai miei primi pazienti, che hanno reso possibile questo studio.

A tutti i pazienti che incontrerò nel mio percorso.

Spero che il mio impegno possa sempre essere all'altezza delle vostre speranze.

INDICE

1. Introduzione.....	5
1.1 Il Sistema Nervoso Periferico	5
1.1.1 GENERALITA'.....	5
1.1.2 ANATOMIA.....	6
1.1.3 FISILOGIA.....	9
1.1.4 FUNZIONI	10
1.2 Le neuropatie periferiche.....	11
1.2.1 EPIDEMIOLOGIA	11
1.2.2 EZIOLOGIA E CLASSIFICAZIONE	12
1.2.3 CARATTERISTICHE CLINICHE	17
1.2.4 MECCANISMI PATOGENETICI.....	23
1.2.5 INDAGINI DIAGNOSTICHE	24
1.3 Le neuropatie ereditarie sensitive ad esordio tardivo	46
1.3.1 GENERALITA'.....	46
1.3.2 CANVAS (Cerebellar Ataxia with Neuropathy and Vestibular Areflexia Syndrome).....	51
1.3.3 AMILOIDOSI EREDITARIA DA TRANSTIRETINA.....	55
2. Razionale e scopo dello studio	60
3. Materiali e metodi.....	62
3.1 Popolazione studiata	62
3.1.1 CRITERI DI INCLUSIONE E DI ESCLUSIONE.....	62

3.2 Valutazioni svolte in questo studio	63
3.2.1 RACCOLTA DELLE INFORMAZIONI ANAMNESTICHE E CLINICHE.....	63
3.2.2 VALUTAZIONI IN SEDE DI ESAME NEUROLOGICO.....	63
3.2.3 VALUTAZIONI NEUROFISIOLOGICHE.....	68
3.2.4 RACCOLTA DEI DATI.....	68
3.3 Metodologie della Neurofisiologia	69
3.3.1 REGISTRAZIONE DI PREP E NEP	69
3.3.2 VISUALIZZAZIONE DELLE TRACCE	73
3.4 Misurazione della conduttanza elettrochimica cutanea	74
3.5 Analisi dei dati	75
4. Risultati.....	77
4.1 Caratteristiche demografiche e cliniche delle popolazioni studiate	77
4.1.1 PAZIENTI CANVAS	77
4.1.2 GRUPPI DI CONTROLLO	79
4.2 Risultati al Sudoscan dei pazienti CANVAS	82
4.3 Questionari per i sintomi disautonomici nella CANVAS	83
4.3.1 CADT%	83
4.3.2 COMPASS-31.....	84
4.4 Potenziali Evocati Dolore-Correlati (PREP) dopo stimolazione random con elettrodo 150 IDE	85
4.4.1 LATENZA MEDIA DI N1, N2 E P2 NEI CANVAS E NEI CONTROLLI	85
4.4.2 AMPIEZZA MEDIA DI N1, N2 E P2 NEI CANVAS E NEI CONTROLLI	86
4.5 Potenziali Evocati Nocicettivi (NEP) dopo stimolazione ritmica con elettrodo 150 IDE	92
4.5.1 LATENZA MEDIA DELLE ONDE DA P30 A P150 NEI PAZIENTI CANVAS E NEI CONTROLLI ...	92

4.5.2	AMPIEZZA MEDIA DELLE ONDE DA P30 A P150 NEI PAZIENTI CANVAS E NEI CONTROLLI .	95
4.6	Differenza d'età tra le due popolazioni: CANVAS e controlli sani.....	106
4.7	NEP come parametro di gravità di malattia tra gli individui affetti da CANVAS.	108
4.8	Compromissione dei portatori ATTRv presintomatici ai NEP	110
4.9	Correlazione tra NEP e scale CMTES e SARA nei pazienti CANVAS	111
5.	Discussione.....	112
5.1	Confronto tra PREP e NEP	112
5.1.1	CONFRONTO TRA PREP E NEP NEI PAZIENTI CANVAS	113
5.1.2	CONFRONTO TRA PREP E NEP NEI SOGGETTI ATTRv PRESINTOMATICI	113
5.2	Coinvolgimento delle piccole fibre nella CANVAS.....	114
5.3	Possibile utilizzo dei NEP come marcatori di malattia nei portatori ATTRv presintomatici	115
5.4	Limiti dello studio e prospettive future	116
6.	Conclusioni.....	117
7.	Bibliografia	118
8.	Ringraziamenti.....	129

1. Introduzione

1.1 *Il Sistema Nervoso Periferico*

1.1.1 GENERALITA'

Il Sistema Nervoso Periferico (SNP) è una componente essenziale del Sistema Nervoso, costituito dai nervi periferici e dai gangli situati al di fuori del Sistema Nervoso Centrale (SNC). Istologicamente parlando, il SNP è costituito dai prolungamenti dei neuroni e dalle cellule satelliti di Schwann, con le quali i neuriti prendono rapporto; a livello del Sistema Nervoso Centrale, invece, le cellule satelliti sono rappresentate dagli oligodendrociti.¹

A questa differenza istologica tra i due sistemi corrisponde una vera e propria transizione anatomica: esiste infatti un punto di passaggio tra SNC e SNP, rappresentato dal punto di emergenza dei nervi cranici e delle radici nervose spinali del neurasse.

Le strutture facenti parte del SNP sono rappresentate da tutte le radici nervose spinali, i gangli della radice dorsale, i nervi spinali, da cui originano i nervi periferici, i plessi brachiale e lombosacrale e le ramificazioni del Sistema Nervoso Vegetativo.¹ Inoltre, rientrano nel SNP anche i nervi cranici, ad esclusione del secondo paio.

1.1.2 ANATOMIA

Nel Sistema Nervoso Periferico riconosciamo una componente somatica e una componente viscerale.

I *nervi somatici* emergono direttamente dal nevrasse e si distribuiscono ai distretti superficiali e muscolo-scheletrici del corpo; sul loro decorso, per lo più nei pressi della loro emergenza, si trovano intercalati i gangli somatici, che sono degli aggregati di neuroni sensitivi.

I *nervi del sistema nervoso viscerale* hanno la funzione di condurre stimoli viscerali, propri della vita vegetativa. Lungo il loro decorso troviamo intercalati i gangli viscerali.

In base al punto di origine dal nevrasse possiamo distinguere nervi spinali e nervi encefalici.

I *nervi spinali* possono a loro volta essere suddivisi in: cervicali, toracici, lombari, sacrali e coccigei.

I *nervi encefalici* sono dodici paia ed emergono pari e simmetrici dalla superficie dell'encefalo e impegnano i fori della base cranica per poi portarsi a livello degli spazi esocranici. Si distribuiscono ad innervare testa e collo, eccezion fatta per il decimo paio (nervo vago), che innerva anche strutture toraciche ed addominali.²

Anatomia microscopica del Nervo Periferico

I nervi sono composti da fasci paralleli di fibre nervose, contenuti entro guaine di tessuto connettivo fibroso. In base alle dimensioni distinguiamo diverse tipologie di fasci: primari, secondari e terziari. Il calibro di un fascio può variare durante il percorso verso la periferia.

Il tessuto connettivo attorno al nervo svolge una funzione protettiva e trofica, dando passaggio ai *vasa nervorum*, e può essere distinto in tre componenti: epinevrio, perinevrio ed endonevrio (elencati in senso centripeto).

L'*epinevrio*, ossia la componente connettivale più esterna, rappresenta una guaina avventizia che riveste il nervo.

Il *perinevrio* è costituito da lamelle cellulari di fibroblasti, uniti tra loro da giunzioni occludenti, alternati a lamine di fibrille di collagene e circonda i fascicoli di fibre nervose.

L'*endonevrio*, infine, è rappresentato da una fine trama connettivale che si porta tra le singole fibre nervose, accompagnando vasi sanguigni e linfatici.²

Classificazione delle Fibre Nervose

Tipo di fibra	Diametro (μm)	Velocità (m/s)	Funzione
Fibre mieliniche di classe A ($A\alpha$)	12 - 20	72 - 120	Sensibilità propriocettiva e tattile superficiale. Fibre di grosso calibro
Fibre mieliniche di classe A ($A\beta$)	6 - 12	36 - 72	Sensibilità propriocettiva e tattile superficiale. Fibre di grosso calibro

Fibre mieliniche di classe A (A δ)	1 - 6	5 - 40	Fibre di piccolo calibro con guaina mielinica sottile, deputate alla nocicezione termica, meccanica e chimica
Fibre mieliniche di classe B	1 - 3	3 - 15	Sensibilità viscerale e fibre effettrici viscerali
Fibre amieliniche di classe C	0,5 - 1,5	0,6 - 1,5	Sensibilità dolorifica e termica; fibre effettrici e viscerali postgangliari

Tabella 1 – Classificazione delle fibre nervose, sul modello di Anastasi, G. et al., *Trattato di Anatomia Umana-Volume Terzo*.²

Le fibre mieliniche vengono così definite per la presenza, attorno agli assoni dei neuroni, della guaina mielinica, formata dall'avvolgimento attorno agli stessi delle cellule di Schwann.

Nello spazio compreso tra il neurite e l'iniziale avvolgimento mielinico (spazio adassonale) ed esternamente alla guaina mielinica (spazio abassonale) è visibile un lembo residuo del citoplasma della cellula di Schwann.¹ I citoplasmici di queste cellule di Schwann, rispettivamente dello spazio adassonale ed abassonale sono connessi dai canali di Schmidt-Lanterman, che attraversano gli strati di mielina avvolta.

Le cellule di Schwann si dispongono in successione a ricoprire l'assone e tra una cellula e l'altra si trova un tratto di assone privo di rivestimento che prende il nome di Nodo di Ranvier, lungo circa 1 μm .

Come si può notare dalle informazioni presenti nella Tabella 1, la presenza della guaina mielinica consente un importante incremento della velocità di conduzione, poiché, grazie all'interposizione di tratti mielinici e Nodi di Ranvier, garantisce una conduzione saltatoria.

1.1.3 FISILOGIA

Distinguiamo prevalentemente due tipi di impulsi che percorrono il Sistema Nervoso Periferico:

- a. *Impulsi afferenti*: riguardano sia la sensibilità somatica che quella viscerale e sono raccolti dalle cellule dei gangli encefalospinali, ossia dai neuroni gangliari con un assone che si divide a T. Il ramo periferico dell'assone si dirige alla periferia e raccoglie gli stimoli, il ramo centrale penetra invece nel nevrasse e trasmette centralmente lo stimolo. Possiamo quindi affermare che la ricezione periferica dello stimolo sensitivo e la sua conduzione al centro avvengono sempre ad opera di un solo neurone.²
- b. *Impulsi efferenti*: nel sistema nervoso periferico somatico l'impulso è trasmesso alla periferia tramite un solo neurone (motoneurone somatico); nel sistema nervoso periferico viscerale invece, lo stimolo raggiunge la periferia tramite due neuroni (neurone pregangliare con sede nel nevrasse, che fa capo a un ganglio, e neurone postgangliare, che dal ganglio raggiunge l'organo innervato).²

1.1.4 FUNZIONI

Il Sistema Nervoso Periferico svolge diverse funzioni, tra le principali troviamo:

- a. *Trasmissione delle informazioni sensoriali*: i nervi sensitivi periferici trasmettono centralmente informazioni provenienti dai recettori sensoriali del nostro organismo (meccanocettori, termocettori, nocicettori).
- b. *Trasmissione dei segnali motori*: i nervi motori periferici trasmettono segnali dal Sistema Nervoso Centrale ai muscoli. L'unità funzionale neuromuscolare è rappresentata dall'unità motoria, costituita da un motoneurone inferiore, il cui soma è situato a livello dei nuclei motori dei nervi cranici nel tronco encefalico o delle corna anteriori del midollo spinale, con il suo assone e le fibre muscolari da questo innervate.³
- c. *Regolazione delle funzioni autonome*: mediate dal Sistema Nervoso Vegetativo, diviso in due rami, simpatico e parasimpatico.
- d. *Risposta a stimoli esterni*: il Sistema Nervoso Periferico contribuisce in maniera fondamentale alla nostra interazione con l'ambiente.

1.2 Le neuropatie periferiche

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA

Le neuropatie periferiche sono un gruppo di disturbi neurologici che coinvolgono i nervi periferici, causando sintomi come ipostenia muscolare e disturbi sensitivi sia negativi che positivi, quali ipoestesia tattile o termodolorifica, parestesie e disestesie.

Le neuropatie periferiche costituiscono un problema neurologico piuttosto frequente. Le polineuropatie simmetriche considerate tutte insieme hanno una prevalenza del 2,5%, mentre le neuropatie da intrappolamento, come la Sindrome del Tunnel Carpale, colpiscono circa il 5% delle donne e lo 0,5% degli uomini.

La loro presentazione clinica varia notevolmente a seconda della gravità, della velocità di progressione, delle strutture anatomiche coinvolte, del tipo di compromissione (assonale o mielinica), della sede del danno e della patogenesi.¹

Questa varietà clinica e l'assenza di criteri diagnostici definiti, ad esempio per rilevare neuropatie periferiche subcliniche (che possono essere identificate solo tramite test elettrofisiologici), rendono difficile l'approccio epidemiologico.

Studi recenti attestano una prevalenza globale media delle neuropatie clinicamente manifeste intorno al 2.4%, ma la percentuale è portata a salire nettamente con l'età: nei pazienti *over 55* si raggiunge una prevalenza dell'8%.¹

Sicuramente la neuropatia periferica più frequente, soprattutto se consideriamo il mondo occidentale, è rappresentata dalla neuropatia diabetica, sia per la frequenza elevata del diabete

mellito nella popolazione, sia per la facilità con cui la patogenesi del diabete coinvolge vasi e nervi.

Spostandosi invece nel Sud-Est Asiatico, in Africa e nell'America del Centro-Sud, la neuropatia più frequente è quella lepromatosa.

Seguono poi le neuropatie che compaiono in contesti di malattie sistemiche (vasculiti, infezioni...), le neuropatie tossico-carenziali, da farmaci, autoimmuni e le neuropatie geneticamente determinate.¹

1.2.2 EZIOLOGIA E CLASSIFICAZIONE

Possiamo classificare le Neuropatie Periferiche secondo diversi criteri:¹

a. In base alla Neuropatologia della lesione:

- *Neuronopatie* (con coinvolgimento del corpo dei neuroni): motorie, sensitive o autonome.
- *Assonopatie*: da degenerazione Walleriana o da assonopatia distale.
- *Mielinopatie con demielinizzazione segmentale*.
- *Neuropatie interstiziali*: infettive, infiammatorie, ischemiche.

b. In base alla Topografia del danno:

- *Mononeuropatia*: solitamente causata da una lesione focale quale intrappolamento, compressione, lesioni vascolari, infiltrazioni neoplastiche o granulomatose.
- *Multineuropatia*: interessamento multifocale di più nervi periferici non contigui, simultaneamente o in successione. Tipicamente avviene nel diabete, nella vasculite, nella sarcoidosi, nell'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e nella neuropatia lepromatosa.

- *Polineuropatia*: interessamento bilaterale e simmetrico dei nervi, spesso lunghezza-dipendente. Tipicamente è dovuta a fattori eziologici che esercitano un danno diffuso sul SNP, come nel caso di neuropatie ereditarie, tossico-carenziali e metaboliche.
- *Poliradicoloneuropatia*: quando sono interessate anche le radici spinali.

c. In base alla Distribuzione del danno:

- *Generalizzata*
- *Simmetrica*
- *Asimmetrica*
- *Monofocale*
- *Multifocale*

d. In base al tipo di disturbo:

- *Motorio*
- *Sensitivo*: dolore, parestesie, disestesie, ipo-anestesia
- *Sensitivo-motorio*
- *Autonomico*
- *Misto*

e. In base alla modalità d'esordio:

- *Acuto* (< 4 settimane)
- *Subacuto* (4-8 settimane)
- *Cronico* (> 8 settimane)

f. In base al tipo di evoluzione:

- *Rapidamente progressiva*
- *Lentamente progressiva*
- *A remissioni e ricadute*

g. In base al coinvolgimento della componente autonoma

h. In base al tipo prevalente di danno:

- *Assonale*
- *Demielinizzante*
- *Misto*

Nonostante la classificazione, diversi meccanismi neuropatologici possono coesistere.¹

Classificazione eziopatologica delle Neuropatie Periferiche

Elenco elaborato sulla base del modello proposto da Loeb, C. & Favale, E. *Neurologia di Fazio Loeb* (Società Editrice Universo, 2003).¹

a. Neuropatie ereditarie geneticamente determinate:

Questo gruppo di neuropatie ha sicuramente una notevole variabilità clinica, tanto che vengono identificati diversi sottogruppi sulla base del fenotipo clinico/neurofisiologico e della modalità di trasmissione.

1. Neuropatie ereditarie motorie distali o DHMN (Distal Hereditary Motor Neuropathies)
2. Malattia di Charcot-Marie-Tooth e neuropatie correlate, precedentemente dette neuropatie ereditarie sensitivo-motorie o HMSN (Hereditary Motor and Sensory Neuropathies)
3. Neuropatie sensitive ed autonome o HSAN (Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathies)
4. Neuropatie associate a degenerazione spinocerebellare
5. Neuropatia Giganto-assonale
6. Neuropatie Ereditarie Metaboliche

b. Neuropatie traumatiche e compressive

c. Neuropatie infiammatorie autoimmuni:

1. Sindrome di Guillan-Barré (GBS) o poliradiculoneuropatia infiammatoria demielinizzante acuta e varianti
2. Poliradiculoneuropatia Infiammatoria Demielinizzante Cronica (CIDP)
3. Neuropatia Motoria Multifocale con blocchi di conduzione (MMN)
4. Nodopatie e paranodopatie autoimmuni

d. Neuropatie infettive:

1. Neuropatia Lepromatosa
2. Neuropatie associate a virus: HIV, virus dell'epatite C (HCV), virus varicella-zoster (VZV)
3. Neuropatia associata a Difterite
4. Neurite di Lyme: associata a Borreliosi
5. Malattia di Chagas: neuropatia da Tripanosomiasi
6. Neuropatia da microrganismi

e. Neuropatie associate a patologie sistemiche

1. Malattia Dismetabolico-disendocrine:
 - Diabete Mellito e intolleranza glucidica
 - Endocrinopatie
 - Epatopatie
 - Uremia
 - Insufficienza respiratoria cronica
2. Amiloidosi:
 - Forme familiari (FAP)
 - Forme secondarie
3. Paraproteinemie
 - Crioglobulinemia
 - Gammopatie Monoclonali
 - Macroglobulinemia di Waldenstrom

- Mieloma Multiplo
 - Mieloma osteosclerotico e sindrome POEMS (discrasia plasmacellulare con polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, proteine monoclonali e alterazioni cutanee)
4. Neoplasie: Neuropatie paraneoplastiche e linfomi
 5. Emopatie
 6. Sarcoidosi
 7. Vasculopatie
 - Vasculiti
 - Ischemia monomelica
 8. Terapia Intensiva
 9. Trapianti d'organo o di midollo osseo

f. Neuropatie carenziali:

1. Alcolismo
2. Malassorbimento ed avitaminosi (es. deficit di vitamina B12)

g. Neuropatie tossiche:

1. Tossici industriali ed ambientali
2. Farmaci, ad esempio chemioterapici

h. Neuropatie da agenti fisici:

1. Elettricità
2. Radiazioni

1.2.3 CARATTERISTICHE CLINICHE

Le neuropatie periferiche si sviluppano a causa di danni alle fibre nervose di vario calibro, che possono colpire il corpo cellulare, l'assone, la guaina mielinica o una combinazione di questi elementi. Queste lesioni causano una serie di sintomi, tra cui "intorpidimento, formicolio, dolore e debolezza". Le grandi fibre nervose sono responsabili delle funzioni motorie e sensitive (sensibilità tattile, vibratoria e propriocezione), mentre le piccole fibre nervose sono coinvolte nella percezione del dolore, della temperatura e regolano le funzioni autonome.⁴

Per valutare e gestire al meglio le neuropatie periferiche sarebbe sempre opportuno usare un approccio sistematico.

Distinguere le neuropatie periferiche dalla patologia del Sistema Nervoso Centrale e da altre patologie è un importante primo passo. Le lesioni del SNC dovrebbero essere sospettate nei pazienti con disturbi del linguaggio, disturbi visivi, coinvolgimento dei nervi cranici o incontinenza intestinale e vescicale, e in soggetti con segni di paralisi centrale.

In pazienti con sintomi asimmetrici con distribuzione dermatomica è fondamentale valutare la presenza di compressione nervosa, radiculopatie o lesioni delle radici nervose periferiche.⁴

Pattern caratteristico

Il pattern più tipico è quello della neuropatia periferica lunghezza-dipendente, solitamente unilaterale e simmetrica.⁵

Normalmente i pazienti lamentano una combinazione di sintomi positivi e negativi. Il sintomo motorio negativo più comune è

rappresentato dalla paralisi flaccida, ossia un deficit di forza (deficit stenico) di entità variabile, accompagnato da iporeflessia o areflessia superficiale e profonda.

La denervazione del muscolo inoltre determina in questi pazienti un problema di trofismo che sfocia in atrofia muscolare prevalentemente distale, con conseguente andatura steppante, dovuta alla caduta del piede per ipostenia ed atrofia del muscolo tibiale anteriore.

A risentire del deficit trofico non sono solamente i muscoli, ma anche la cute e l'osso. La cute in particolare può risultare assottigliata, fragile, poco elastica e tendente all'ulcerazione.¹

I sintomi motori positivi più comuni invece sono rappresentati da fascicolazioni e miochimie, le quali possono comparire soprattutto nelle poliradiculoneuropatie infiammatorie demielinizzanti e nelle mononeuropatie su base traumatica o da compressione.¹

Parlando invece di sintomi sensitivi negativi dobbiamo sicuramente citare l'ipoestesia e l'anestesia, ossia la riduzione o la perdita completa della sensibilità. Questi sintomi sensitivi negativi spesso sono i primi ad insorgere e precedono nel tempo la comparsa dei sintomi motori, se presenti.

Tipicamente i deficit sensitivi hanno una progressione disto-proximale; si tratta solitamente di parestesie a tipo formicolio e sensazione di intorpidimento con distribuzione a calza e a guanto.⁶

In base al calibro delle fibre che sono coinvolte nella patologia varia il tipo di sensibilità coinvolte dal deficit. Il coinvolgimento delle fibre di piccolo calibro (fibre mieliniche di piccolo calibro A δ con diametro inferiore a 2 μ m e fibre amieliniche C) rende ragione di sintomi relativi alla sensibilità termica e dolorifica, mentre il coinvolgimento delle fibre di grosso calibro (fibre A β) porta a deficit relativi alla sensibilità tattile e vibratoria.

Il coinvolgimento prevalente di fibre di piccolo calibro è caratteristico di diverse forme di neuropatia diabetica, amiloidosica, lepromatosa

e di alcune neuropatie ereditarie sensitive e malattie da accumulo, come la Malattia di Tangier e la Malattia di Fabry.¹

Quando sono coinvolte le sensibilità profonde, può esserci una compromissione della propriocezione, evidenziabile clinicamente con la comparsa di atassia o con la positività del test di Romberg (perdita dell'equilibrio alla chiusura degli occhi durante il mantenimento della stazione eretta a piedi uniti).

Infine, possiamo avere dei sintomi sensitivi positivi quali disestesie e parestesie.

Le disestesie sono delle sensazioni sgradevoli evocate da stimoli che normalmente non dovrebbero essere percepiti come fastidiosi; le parestesie invece sono delle sensazioni soggettive di intorpidimento, fasciatura, formicolio o puntura di spillo causate da scariche ectopiche a partenza dai recettori periferici o dai prolungamenti periferici dei neuroni pseudounipolari contenuti nei gangli delle radici dorsali.^{1,6}

Un fondamentale aspetto clinico dei pazienti con neuropatia periferica è rappresentato dal dolore neuropatico, che si presenta solitamente come scossa elettrica o sensazione di bruciore, soprattutto a livello delle estremità.

Il dolore neuropatico colpisce circa 1/3 dei pazienti neuropatici.⁴ Questo dolore può avere diversi pattern di presentazione: dolore pungente, dolore urente, dolore tipo shock elettrico, allodinia (percezione di uno stimolo normalmente non doloroso come doloroso), iperalgesia (esagerata risposta ad uno stimolo dolorifico), iperestesia.⁴

Il dolore neuropatico è un dolore che origina dalle fibre nervose ed è dovuto ad una loro lesione o ad un danno della loro guaina mielinica.

Questo sintomo è tipico di alcune neuropatie, definite pertanto dolorose, come per esempio la neuropatia ereditaria sensitiva ed

autonomica o la neuropatia diabetica, paraneoplastica o carenziale.⁶

Spesso le neuropatie possono associarsi a deformità osteo-articolari, tipico di alcune forme è proprio il cosiddetto piede cavo, con un'arcata plantare eccessivamente accentuata, con frequentemente annessa la presenza di dita a martello e di cifoscoliosi.¹

Coinvolgimento autonomico

In questi pazienti sarà inoltre fondamentale indagare la compromissione autonoma, che può manifestarsi tramite un corollario di sintomi quali:

ipotensione ortostatica, gastroparesi, cambiamenti nella funzione intestinale e vescicale, disfunzione erettile e visione offuscata; o sintomi vasomotori come secchezza degli occhi, della bocca o della pelle, e sensazione di bruciore o arrossamento cutaneo o mucosale.⁴

Sembra che alla base dei sintomi disautonomici risieda il coinvolgimento delle sopracitate fibre di piccolo calibro.

Il danno a carico delle fibre mieliniche di piccolo calibro e delle fibre amieliniche può infatti causare sintomi quali ipotensione ortostatica, tachicardia a riposo, disfunzione erettile, disturbi sfinterici, sazietà precoce, alterazioni dell'alvo, anidrosi o eccessiva sudorazione delle estremità e rare alterazioni pupillari (miosi e ridotta risposta alla luce, presenti talvolta in corso di neuropatia diabetica o amiloidosica).^{1,6}

Tipi clinici di neuropatie periferiche

<u>ONSET ACUTO</u>	Sindrome di Guillain-Barré
	Porfiria
	Neuropatie tossiche (da arsenico, da nitrofurantoina...)
	Neuropatie da immunizzazione
	Neuropatie in un quadro di differite
	Forme tumorali maligne (neuropatie paraneoplastiche)
	Neuropatia diabetica
<u>PREVALENTEMENTE MOTORIE</u>	Sindrome di Guillain-Barré
	Porfiria
	Neuropatie in quadro di differite
	Malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT)
	Neuropatia diabetica con amiotrofia diabetica
	Intossicazione da piombo
<u>PREVALENTEMENTE SENSITIVE</u>	Neuropatia lepromatosa
	Neuropatia diabetica con polineuropatia distale sensitiva
	Neuropatia da deficit di B12
	Forme tumorali maligne (neuropatie paraneoplastiche)
	Neuropatie ereditarie sensitive ed autonome
	Amiloidosi familiare
	Uremia
	Morbo di Lyme
	Sindrome di Sjogren

<u>RADICOLARI</u>	Neuropatia diabetica troncale
	Morbo di Lyme
	Sindrome di Sjogren
<u>NEUROPATIE DOLOROSE</u>	Neuropatie carenziali (alcol, deficit nutrizionali)
	Neuropatia dolorosa acuta in corso di diabete
	Neuropatie ereditarie sensitive ed autonome (soprattutto HSN di tipo 1)
	Neuropatia da arsenico
	Crioglobulinemia
	Morbo di Lyme
	Neuropatia paraneoplastica sensitiva
	Neuropatie in corso di vasculiti

Tabella 2 – Tipi clinici di neuropatie periferiche, sul modello di McLeod, J. G. *Investigation of peripheral neuropathy*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 58, 274–283 (1995).⁶

Nonostante quanto sopra detto, è piuttosto difficile descrivere un quadro clinico unico per le neuropatie periferiche, perché sono moltissime e presentano caratteristiche cliniche diverse le une dalle altre. L'unico modo efficace per poter discriminare correttamente le varie forme ed eziologie è seguire una buona *flowchart*, utilizzando le corrette indagini diagnostiche.

1.2.4 MECCANISMI PATOGENETICI

Esistono tre principali processi patologici che colpiscono il SNP: la degenerazione assonale, la demielinizzazione segmentale e la neuronopatia.

La *degenerazione assonale* è il meccanismo patogenetico più comunemente presente nelle patologie sistemiche, metaboliche, tossiche e carenziali. Questo tipo di danno tende a colpire le fibre lunghe e di grosso calibro, determinando una assonopatia distale o una neuropatia ascendente.

La *demyelinizzazione segmentale* è dovuta ad una distruzione primaria della mielina che però lascia intatto l'assone. In corso di neuropatia demielinizzante è comunque possibile che si verifichi anche un danno assonale e, viceversa, la demielinizzazione segmentale può anche essere secondaria a un danno primitivamente assonale.⁶ Questo si verifica soprattutto nelle fasi avanzate delle neuropatie.

Le *neuronopatie* incorrono invece quando sono primariamente colpiti i corpi cellulari degli assoni (ossia le cellule delle corna anteriori del midollo spinale o dei gangli delle radici dorsali).⁶

E' inoltre possibile parlare di neuropatie interstiziali qualora siano danneggiate le strutture connettivali e vascolari del nervo.¹

Per differenziare queste forme patogenetiche, è di fondamentale importanza effettuare degli studi elettrofisiologici. Non sempre è però semplice discriminare un danno primitivamente assonale o demielinizzante, soprattutto nel caso di neuropatie gravi in fase avanzata. Inoltre, nelle neuropatie traumatiche più gravi si può verificare un coinvolgimento di tutte e tre le componenti del nervo.

Sebbene molto schematico e chiaro, il criterio neuropatologico è poco applicabile alla clinica, anche se sulla biopsia nervosa, di cute e di muscolo permette

di accertare il tipo di danno istologico dominante (assonale, demielinizzante o interstiziale) ed anche quali assoni siano preferenzialmente colpiti (di grande o piccolo calibro; sensitivi, motori, autonomici), elementi desumibili solo indirettamente dagli esami paraclinici elettrofisiologici e per neuroimmagini o da quadri clinici particolarmente indicativi prevalentemente algici, atassici o disautonomici.¹

1.2.5 INDAGINI DIAGNOSTICHE

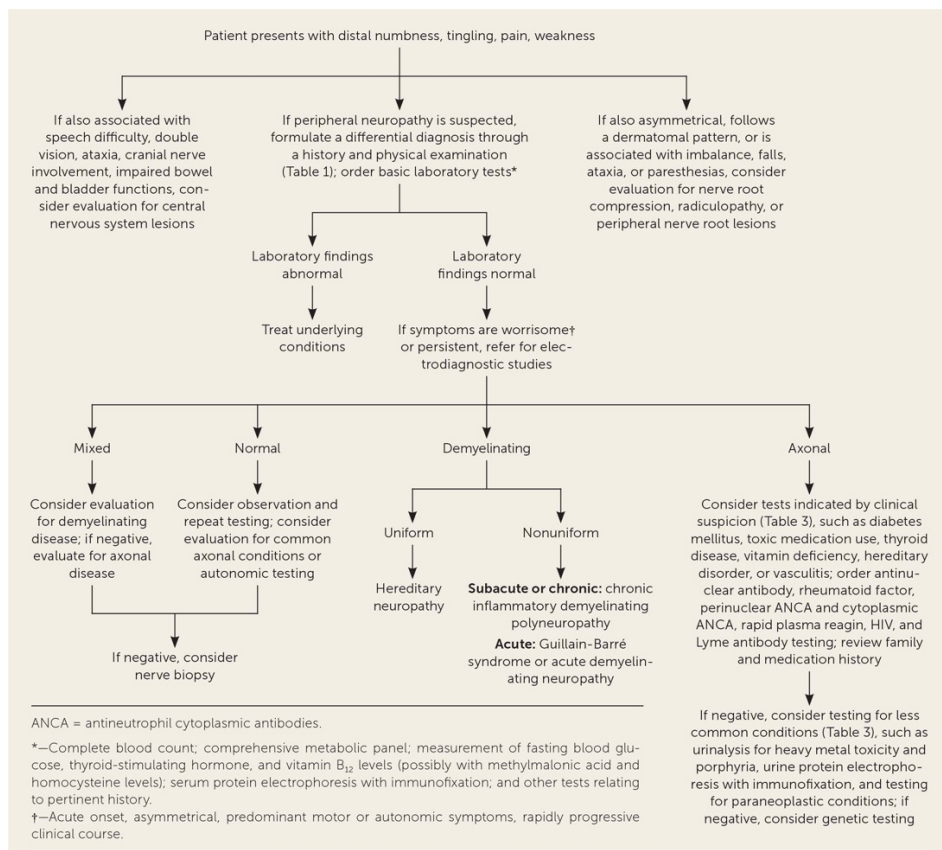


Figura 1 - Approccio alla diagnosi delle neuropatie periferiche secondo il modello di Azhary H, Farooq MU, Bhanushali M, et al. *Peripheral neuropathy: differential diagnosis and management* (American Family Physician 81(7):887-892, 2010).⁷

Anamnesi e raccolta della storia clinica e familiare

Nel sospetto di una neuropatia periferica, una diagnosi differenziale dovrebbe essere formulata attraverso un'anamnesi accurata e l'esame obiettivo. La distribuzione anatomica dei sintomi della neuropatia periferica, che può essere categorizzata come focale, multifocale o simmetrica, spesso fornisce informazioni importanti per la definizione clinica.⁴

La neuropatia periferica simmetrica può essere ulteriormente classificata come distale o prossimale. Modelli meno comuni di neuropatia periferica coinvolgono invece i nervi cranici, i nervi autonomici e i nervi degli arti superiori.

E' essenziale raccogliere al meglio la storia del paziente perché l'insorgenza e la durata dei sintomi possono essere molto utili nel restringere lo spettro di diagnosi differenziali. Inoltre, trovare in anamnesi la presenza di fattori aggravanti e remissivi può essere indice di cause esogene.

Nel raccogliere la storia clinica del paziente è necessario prestare particolare attenzione ad alcuni elementi, quali per esempio:

- a. L'esposizione a tossine e farmaci;
- b. Malattie che possano causare neuropatia, come la malattia di Lyme o l'HIV;
- c. Traumi;
- d. Storia familiare di malattie neurologiche o deformità scheletriche;
- e. Viaggi recenti;
- f. Infezioni o vaccinazioni nelle settimane precedenti: poiché infezioni e vaccinazioni contro patogeni come Virus dell'influenza, Meningococco ed Herpes Zoster possono raramente essere causa di Sindrome di Guillain-Barré;
- g. Una storia di goffaggine infantile, arcate plantari alte (indicative di piede cavo) o difficoltà con le calzature e l'acquisizione delle

tappe di deambulazione possono invece suggerire una neuropatia ereditaria.⁴

Nell'eventuale sospetto di neuropatia ereditaria sarà poi fondamentale raccogliere, in un albero genealogico, la storia familiare del paziente e dei parenti prossimi quali genitori, nonni, fratelli, figli, zii e cugini e documentarsi sui luoghi di nascita dei coniugi presenti nell'albero, essendo la consanguineità dei genitori una possibile causa della manifestazione di malattia autosomica recessiva nei figli.

Importanza del criterio temporale

Nelle forme insorte recentemente i sintomi sono tipicamente limitati alle porzioni più distali, mentre procedendo nella storia clinica i sintomi tendono ad espandersi prossimalmente con intorpidimento prossimale, debolezza ed atrofia.⁸

E' fondamentale distinguere le forme acute (con esordio nell'arco di quattro settimane o meno) dalle forme subacute (esordio in quattro-otto settimane) e dalle forme croniche (esordio in un arco temporale superiore alle otto settimane, spesso nell'ordine dei mesi o degli anni). In base all'esordio temporale possiamo infatti orientarci verso una possibile eziologia: per esempio tende ad essere acuta la manifestazione di una Sindrome di Guillain-Barré o di una vasculite, mentre hanno un decorso più tipicamente cronico le forme geneticamente determinate.⁸

Oltre a valutare la modalità d'esordio è fondamentale valutare il decorso nel tempo di queste patologie, che può essere monofasico, progressivo o recidivante-remittente.⁸

Esame obiettivo neurologico

In sede di esame obiettivo neurologico sarà indispensabile indagare le funzioni motorie, sensitive e vegetative autonome del nostro paziente, nell'ottica di inquadrare al meglio la sua neuropatia. Questi tre domini possono essere interessati singolarmente o in combinazione.⁹

Per eseguire un esame neurologico completo è bene indagare la forza globale e segmentale, le sensibilità superficiali e profonde, i riflessi e l'andatura del paziente.^{5,6}

Sarà poi necessario valutare la distribuzione dei disturbi neurologici, sia per quanto riguarda i segmenti corporei interessati, sia per quanto riguarda la distribuzione del danno lungo il nervo. Se infatti si riscontra una neuropatia simmetrica lunghezza-dipendente, si deve tenere a mente che questa si associa più frequentemente ad un'eziologia tossica, metabolica o ereditaria, mentre le neuropatie asimmetriche sono spesso dovute a cause disimmuni o infettive.⁹

È fondamentale indagare se la localizzazione dei sintomi all'esordio fosse prossimale o distale e se fossero coinvolti primariamente gli arti superiori o inferiori.¹⁰ Infatti l'interessamento fin dall'inizio sia delle mani che dei piedi deve indurre il sospetto di particolari forme di neuropatia, come una Sindrome del Tunnel Carpale (che può svilupparsi isolatamente, ma anche in associazione ad una polineuropatia periferica) o un'eziologia tossica.⁵

Come abbiamo già detto, possono essere compromesse esclusivamente, prevalentemente o in combinazione le funzioni sensitive, motorie e vegetative.⁹ Molte neuropatie acquisite sono caratterizzate dalla presenza di sintomi sensitivi positivi, che invece compaiono meno frequentemente nelle forme su base ereditaria.⁹

Per l'esame delle funzioni sensitive è essenziale la collaborazione del paziente. Occorre indagare sensibilità tattile, pallestesia

(sensibilità vibratoria), batiestesia (percezione della posizione di segmenti corporei), cinestesia (percezione del movimento di segmenti corporei) e sensibilità termo-dolorifica (attraverso l'utilizzo di un ago sterile e di provette contenenti acqua calda e fredda).¹⁰

Per quanto riguarda la funzione motoria, è di fondamentale importanza osservare postura e andatura del paziente, valutando anche la capacità o meno di camminare su punte, talloni ed *in tandem* (come un funambolo, con un piede davanti all'altro). Per evidenziare in sede di esame obiettivo la compromissione delle sensibilità profonde si può usare come parametro la positività del segno di Romberg, che consiste in una perdita di equilibrio che si verifica alla chiusura degli occhi in un paziente in posizione eretta con i piedi ravvicinati. Il deficit di sensibilità in questo caso esita in un'atassia parzialmente correggibile con l'ausilio della vista. Fondamentale è poi l'esame della forza segmentale, che ci permette di attribuire a ciascun muscolo esaminato un punteggio, secondo la scala MRC (*Medical Research Council*), riportata di seguito.¹¹

Punteggio	Entità della forza
5	Forza normale: movimento possibile contro resistenza massima
4	Movimento possibile solo contro resistenza minima
3	Movimento possibile contro gravità
2	Movimento possibile a gravità eliminata
1	Contrazione muscolare senza movimento
0	Assenza di movimento

Tabella 3 – Punteggio per la valutazione della forza segmentale agli arti, secondo la scala MRC (*Medical Research Council*).

Si passa poi alla valutazione dei riflessi osteo-tendinei, una lesione delle fibre di grosso calibro infatti può portare ad una loro riduzione o perdita (in tal caso si parla di riflessi non elicetabili).

Nel sospetto invece di disturbi del Sistema Nervoso Autonomo o di una neuropatia delle piccole fibre mieliniche, occorre valutare la risposta della frequenza cardiaca all'iperventilazione ed alla manovra di Valsalva, le modifiche della pressione arteriosa a seguito del passaggio dal clinostatismo all'ortostatismo ed eventualmente la risposta sudomotoria cutanea, utilizzando ad esempio uno strumento apposito come il SudoScan.¹ La valutazione strumentale delle funzioni vegetative è particolarmente importante nel sospetto di neuropatia ereditaria sensitivo-autonomica, porfria e neuropatia amiloidosica o diabetica, pur essendo possibile una lieve compromissione del Sistema Nervoso Autonomo anche nel corso di altre neuropatie, in particolare nella Sindrome di Guillain-Barré.¹

Per completare l'esame obiettivo neurologico occorre spostare il focus dal Sistema Nervoso e avere uno sguardo d'insieme più ampio, valutando anche deformità scheletriche, alterazioni della cute e degli annessi, disturbi oculari come la xeroftalmia, o altri sintomi indicativi di Sindrome Sicca (xerostomia, secchezza cutanea e genitale).¹

Indagini di laboratorio

Le indagini di laboratorio rappresentano sicuramente un primo step nella diagnosi differenziale di una neuropatia periferica.⁶

Le indagini di laboratorio di base, che devono essere eseguite su tutti i pazienti con neuropatia periferica di eziologia indeterminata, comprendono l'analisi delle urine, l'emoglobina, la conta dei globuli bianchi con formula leucocitaria, le piastrine, la velocità di

eritrosedimentazione, la glicemia a digiuno, l'emoglobina glicata, gli elettroliti sierici, l'elettroforesi delle proteine sieriche e l'immuno-elettroforesi, la creatinina sierica, i test di funzionalità epatica e i test di funzionalità tiroidea.⁶

Se queste indagini non forniscono una diagnosi, si può passare a test di laboratorio più specifici come le concentrazioni sieriche di vitamina E, colesterolo e trigliceridi sierici, le crioglobuline, il dosaggio dei metalli pesanti urinari e delle porfirine, la ricerca di anticorpi antinucleo, del fattore reumatoide, degli anticorpi tipici della Sindrome di Sjogren (SS), in particolare SS-A (anti-Ro) e SS-B (anti-La), o ancora la sierologia per la Malattia di Lyme e l'HIV, gli anticorpi antigangliosidi GM1, il test di Schirmer (sempre utile nell'indagine della Sindrome Sicca) e lo screening per la malignità occulta con esami endoscopici e radiologici.⁶

Per quanto riguarda il deficit di vitamina B12, occorre misurarne i livelli sierici e, se questi risultano al limite inferiore della norma (200-500 pg/dL), valutare anche l'acido metilmalonico ed eventualmente l'omocisteinemia, perché questi risultano alterati anche in presenza di livelli di vitamina B12 all'interno dell'intervallo di normalità nel 5-10% dei pazienti.^{12,13,14}

Elettrofisiologia

La valutazione elettrofisiologica è costituita da due diversi esami: l'elettromiografia (EMG) e l'elettro-neurografia (ENG) o studio di conduzione nervosa, che sono da considerarsi come un'estensione dell'esame neurologico.¹⁰

ELETTROMIOGRAFIA:

L'elettromiografia si esegue tramite l'inserzione di un elettrodo ad ago all'interno del muscolo e può consentire di registrare un'attività elettrica indicativa di denervazione acuta o cronica con reinnervazione delle unità motorie, permettendo di discriminare tra patologie che colpiscano primariamente nervo o muscolo.

I segni elettromiografici di danno nervoso sono rappresentati da potenziali positivi e potenziali di fibrillazione, entrambi indicativi di denervazione, aumento della latenza dei potenziali d'azione, incremento dei potenziali polifasici a punte lunghe, presenza sotto massimo sforzo di tracciato di singole oscillazioni o intermedio.¹

I potenziali di fascicolazione sono raramente presenti nelle neuropatie periferiche, essendo più tipicamente riscontrati in caso di danno ai neuroni delle corna anteriori.¹⁰

ELETTTRONEUROGRAFIA:

L'eletttroneurografia è il metodo che permette di studiare la conduzione motoria e sensitiva periferica stimolando un punto del nervo e registrando i potenziali composti propagati a distanza.¹

La velocità di conduzione nervosa si misura proprio calcolando la distanza tra il punto di stimolazione e quello di registrazione e dividendola per il tempo trascorso tra stimolazione e potenziale.

Gli studi di conduzione nervosa giocano un ruolo fondamentale nel confermare la presenza di una neuropatia periferica, e spesso sono anche utili nello stabilirne una causa.

L'elettrofisiologia, infatti, permette di distinguere una mononeuropatia da una mononeuropatia multipla e da una polineuropatia. Permette inoltre di discriminare se una polineuropatia generalizzata sia simmetrica o asimmetrica, se siano coinvolte sia le componenti motorie che quelle sensitive o solo una delle due, e se il meccanismo di danno sia primitivamente assonale

o demielinizzante, consentendo quindi di ipotizzare anche le possibili eziologie.^{15,16}

Nella maggior parte delle neuropatie ereditarie demielinizzanti, infatti, la riduzione della velocità di conduzione coinvolge diffusamente e con la stessa gravità tutti i nervi esaminati, con conseguente mancanza di blocchi di conduzione e di dispersione temporale, proprio perché il danno si sviluppa lentamente e colpisce tutte le fibre nervose.^{17,18}

I blocchi di conduzione e la dispersione temporale sono invece più tipici delle neuropatie demielinizzanti acquisite, avendo il danno una distribuzione multifocale.¹⁹ In questo caso, quindi, l'entità della riduzione della velocità di conduzione è diversa sia tra nervi differenti dello stesso arto che tra i segmenti prossimali e distali di uno stesso nervo. In pazienti affetti da polineuropatia infiammatoria cronica demielinizzante, inoltre, si riscontrano potenziali di fibrillazione all'EMG ad ago nel 70% dei casi.²⁰

Gli studi elettrofisiologici andrebbero condotti sia sui nervi colpiti dalla patologia che sui nervi sani, basandosi sulla clinica.

Bisognerebbe inoltre indagare sia nervi degli arti superiori che nervi degli arti inferiori, ad esempio valutando la conduzione motoria e sensitiva nei nervi mediani e ulnari, motoria e sensitiva nei peroneali comuni e nei tibiali posteriori, e sensitiva nei surali.⁶

Ogni qual volta si esegua uno studio elettrofisiologico sarebbe bene tenere in considerazione l'età del paziente, considerando che per esempio nel neonato a termine le velocità di conduzione sono circa la metà di quelle dell'adulto, ma già a 3-5 anni d'età aumentano fino al range dell'adulto. A partire dai 40 anni d'età, invece, si osserva una progressiva lieve riduzione delle velocità di conduzione.⁶

E' importante, in sede d'esame, controllare la temperatura degli arti, eventualmente correggendola, perché sulla base della temperatura variano le velocità di conduzione (nel passaggio dai 29 ai 38°C la velocità varia di 2,4 m/s per ogni °C di differenza).^{21,22}

Tramite le indagini neurofisiologiche è anche possibile valutare la distribuzione della neuropatia (lunghezza dipendente, non lunghezza dipendente o multifocale), il decorso temporale (acuto o cronico) e la gravità del processo neuropatico.

Gli studi di conduzione motoria consistono nella stimolazione di un nervo andando a registrare la risposta a livello di un muscolo innervato dal nervo in questione. Si misura così il potenziale d'azione muscolare composto (CMAP), con ampiezza nell'ordine dei millivolt, ottenuto dalla sommazione dei potenziali d'azione delle singole fibre muscolari.

Negli studi di conduzione sensitiva, invece, si stimola il nervo in un sito andando a registrare il potenziale d'azione a livello di un secondo sito dello stesso nervo, con potenziali nell'ordine dei microvolt.

L'ampiezza dei potenziali registrati durante gli studi di conduzione nervosa è determinata principalmente dal numero di assoni coinvolti nella propagazione dell'impulso, mentre la velocità di conduzione dipende dalla velocità delle fibre a conduzione più rapida, ovvero le fibre mieliniche di grosso calibro.

Le velocità di conduzione motoria vengono registrate utilizzando elettrodi di superficie. Si misurano così le ampiezze del CMAP ottenuto dopo stimolazione nei siti distali e prossimali del nervo; la ridotta ampiezza del CMAP nei siti di stimolazione distali è indicativa di degenerazione assonale o, raramente, di demielinizzazione delle fibre motorie distali.

Una significativa riduzione dell'ampiezza del potenziale d'azione muscolare durante lo spostamento dell'elettrodo di stimolazione da un sito distale a uno più prossimale è una prova a sostegno del blocco di conduzione.²³

Per blocco di conduzione si intende infatti un decremento almeno del 50% dell'ampiezza del CMAP ottenuto per stimolazione

prossimale rispetto a quello ottenuto per stimolazione distale al di fuori delle sedi di compressione del nervo (nervo mediano nel tunnel carpale, nervo ulnare al gomito e nervo fibulare al collo del perone). Si può comunque sospettare un blocco di conduzione se vi è una riduzione dell'ampiezza superiore al 20% (a condizione che vi sia una variazione inferiore al 15% nella durata del CMAP tra i siti di stimolazione prossimale e distale²⁴, poiché la dispersione e i potenziali d'azione polifasici possono causare cancellazione di fase).²⁵ La dispersione temporale è invece caratterizzata da un aumento superiore al 30% della durata del CMAP ottenuto da stimolazione prossimale rispetto a quello ottenuto da stimolazione distale ed è causata dalla desincronizzazione della conduzione lungo le varie fibre nervose che compongono il nervo. E' quindi dovuta a demielinizzazione segmentale. Per evitare falsi positivi è necessario che l'ampiezza del CMAP distale sia superiore a 1 mV (o superiore al 20% del limite inferiore del normale).²⁵ Altri elementi a sostegno di un meccanismo di danno primariamente demielinizzante sono un prolungamento delle latenze motorie distali e una riduzione della velocità di conduzione inferiore all'80% del limite inferiore della norma in due o più nervi motori.^{24,26}

Nella degenerazione assonale invece si verifica un rallentamento normale o solo lieve della conduzione, dovuto alla perdita delle fibre danneggiate di grande calibro, mentre le restanti fibre intatte hanno velocità di conduzione normali.

Altre prove di degenerazione assonale sono una riduzione dell'ampiezza del CMAP e il riscontro all'elettromiografia di segni di denervazione.

Va tenuto in considerazione che lievi gradi di rallentamento della conduzione non escludono la possibilità di una sottostante demielinizzazione segmentale nei nervi periferici.^{16,27}

La conduzione sensitiva è solitamente compromessa, con ampiezze ridotte dei potenziali d'azione, sia nella degenerazione

assonale che nella demielinizzazione segmentale. Sebbene i potenziali d'azione sensitivi siano difficili da registrare su lunghe distanze nei nervi danneggiati, la conduzione rallentata e la dispersione dei potenziali d'azione possono essere registrati nella demielinizzazione segmentale con tecniche appropriate.

Poiché le conduzioni motorie e sensitive vengono misurate di routine solo nelle fibre di grande calibro con tecniche di conduzione nervosa standard, possono essere normali nelle neuropatie delle piccole fibre.⁶

E' importante valutare le onde F e in particolare la loro latenza. Le onde F sono onde tardive che possono essere registrate dai muscoli dopo aver apportato una stimolazione sovramassimale del nervo e derivano dalla conduzione antidromica degli impulsi nervosi con successiva risposta delle cellule delle corna anteriori del midollo spinale.²⁹

Le onde F forniscono una misura della conduzione su tutta la lunghezza del nervo motore e rappresentano un modo utile per registrare la conduzione nei segmenti prossimali, fino a identificare lesioni a livello delle radici anteriori dei nervi periferici.²²

La valutazione dell'onda F è utile qualora sospettassimo una poliradiculoneuropatia infiammatoria acuta (come una sindrome di Guillain-Barré) o cronica, per valutare il rallentamento della conduzione prossimale, che può essere l'unico segno nelle fasi precoci della malattia.³⁰

I Potenziali Evocati Somato-sensitivi (SEP) invece si ottengono stimolando per via transcutanea un nervo e registrando la risposta a vari livelli della via sensitiva.

Hanno applicazioni limitate, ma risultano utili in particolare nel sospetto di Polineuropatia Cronica Infiammatoria Demielinizzante in presenza di dati elettrofisiologici non indicativi e per la

valutazione di un eventuale rallentamento del tempo di conduzione centrale a causa di problematiche per esempio midollari.³¹

Le neuropatie lunghezza-dipendenti sono solitamente caratterizzate dalla scomparsa dei potenziali sensitivi alle estremità distali degli arti inferiori (a livello dei nervi peroneo superficiale e surale) prima che agli arti superiori.³²

In presenza di un deficit evidente delle sensibilità profonde, la normalità dei potenziali sensitivi suggerisce una patologia delle radici o centrale.³²

Risultati normali agli esami neurofisiologici, come già accennato, non escludono una neuropatia delle piccole fibre, dal momento che questi studi non valutano l'integrità delle fibre C e delle piccole fibre mieliniche A δ .^{5,33}

Esame del Liquido Cefalo-Rachidiano (LCR)

Nella maggior parte dei casi di neuropatia assonale una puntura lombare con esame del LCR è poco informativa, mentre ha una maggiore utilità nelle neuropatie demielinizzanti.⁶

Anche se la diagnosi di Sindrome di Guillain-Barré è clinica, l'aumento delle proteine nel LCR avviene già nella prima settimana. Il riscontro di un contestuale aumento delle cellule su liquor deve indurre a valutare l'eventuale presenza di infezione da HIV, citomegalovirus o borrelia burgdorferi (malattia di Lyme).^{34,35,36}

La dissociazione albumino-citologica (aumento della proteinorachia con numero di cellule normale o comunque inferiore a 10/uL) si verifica anche nella CIDP e può aiutare a distinguere questa condizione dalle neuropatie demielinizzanti ereditarie. Sulla base degli ultimi criteri diagnostici, la dissociazione albumino-citologica viene considerata un criterio di supporto in pazienti che

soddisfano i criteri clinici di CIDP ma in cui l'elettrofisiologia consente di raggiungere solo una diagnosi di CIDP possibile.³⁷

In generale, comunque, un elevato livello di proteine nel LCR suggerisce cause infiammatorie e demielinizzazione delle radici spinai o entrambe.⁶

Indagini genetiche

Insieme, le neuropatie ereditarie rappresentano il più grande gruppo di condizioni degenerative che colpiscono il Sistema Nervoso Periferico. Questo ci spiega l'importanza delle indagini genetiche. All'interno del più ampio contesto delle neuropatie ereditarie si trovano la malattia di Charcot-Marie-Tooth, le neuropatie sensitive e autonome ereditarie (HSAN) e le neuropatie motorie ereditarie (HMN). Tutte queste sottocategorie rappresentano entità cliniche con un'ampia variabilità genotipica e fenotipica, con la malattia di Charcot-Marie-Tooth che rappresenta il gruppo di neuropatie ereditarie più comuni.³⁸

Malattia di Charcot-Marie-Tooth:

In presenza di storia familiare di neuropatia o di alterazioni scheletriche suggestive di neuropatia ereditaria, come piede cavo e dita a martello, è opportuno procedere all'esecuzione di indagini di genetica molecolare, allo scopo di evidenziare l'eventuale alterazione genica responsabile della patologia. La scelta del gene da studiare deve essere guidata dalla clinica, tenendo conto in particolare dei risultati degli studi elettrofisiologici e della probabile modalità di trasmissione della neuropatia all'interno della famiglia.¹²

La malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT) è un gruppo eterogeneo di neuropatie sensitivo-motorie ereditarie, a trasmissione

autosomica dominante, autosomica recessiva o anche *X-linked*. L'insieme di queste neuropatie rappresenta il 90% di tutte le neuropatie ereditarie.¹

Si tratta di neuropatie miste sensitivo-motorie caratterizzate solitamente da un deficit soprattutto motorio distale con ipostenia, ipo-atrofia peroneale e iporeflessia profonda associato frequentemente ad ipoestesia sia superficiale che profonda distale.¹

Le CMT possono essere distinte in forme demielinizzanti (CMT1) e forme assonali (CMT2).³⁹ Per distinguere le forme demielinizzanti da quelle assonali ci si basa sulla neurofisiologia, in particolare andando a vedere la velocità di conduzione motoria (VCM) del nervo ulnare o del nervo mediano a livello dell'avambraccio, prendendo come *cut-off* il valore di 38 m/sec: le forme con VCM > 38 m/sec sono assonali, quelle con VCM < 38 m/sec sono demielinizzanti.^{40,41}

All'interno di questi due gruppi è poi possibile distinguere delle sottocategorie sulla base della modalità di trasmissione e della genetica molecolare.

Per esempio, in presenza di una polineuropatia demielinizzante ad ereditarietà autosomica dominante, la prima indagine da effettuare è la ricerca di duplicazioni a carico del gene codificante per la proteina mielinica periferica di 22 kDa (PMP22), responsabile della forma di malattia di Charcot-Marie-Tooth definita CMT1A, che costituisce il 70% dei casi di CMT1.¹² Questa forma si manifesta solitamente nella seconda-terza decade di vita con ipostenia distale che colpisce soprattutto i muscoli tibiale anteriore, estensore proprio dell'alluce e gastrocnemio.¹ Il paziente tipicamente presenta inizialmente difficoltà nella corsa con successiva possibile comparsa di disturbo della deambulazione con assunzione di andatura steppante. Il quadro clinico si caratterizza anche per

disturbi sensitivi come parestesie ed ipoestesie superficiali e profonde. Tipiche sono anomalie scheletriche come piede cavo e dita del piede “a martello”.¹

Se all'interno della famiglia si è verificata trasmissione da madre a figlio, ma non vi è mai trasmissione da padre a figlio della neuropatia, si può sospettare una forma legata al cromosoma X ed occorre quindi ricercare mutazioni a carico del gene *GJB1*, codificante per la connessina 32 e responsabile della cosiddetta CMT1X, che rende conto di circa il 12% di tutti i casi di CMT.

Se non si riscontrano alterazioni a carico di questi geni, è opportuno valutare la presenza di mutazioni del gene *MPZ*, codificante per la proteina mielinica zero (P0), mutato nel 5% circa dei casi e responsabile della forma 1B di CMT.

Nel caso in cui si abbia invece una polineuropatia assonale a verosimile trasmissione autosomica dominante, occorre escludere innanzitutto mutazioni a carico del gene *MFN2*, codificante per la mitofusina 2 e responsabile della maggior parte delle forme ereditarie assonali, anche conosciute come CMT2.¹²

Con l'introduzione nella pratica clinica delle nuove tecniche di sequenziamento genetico (*Next Generation Sequencing* – NGS), in realtà, dopo aver escluso la presenza di duplicazioni o delezioni a carico del gene *PMP22*, si procede solitamente direttamente all'analisi di un pannello di geni associati a neuropatia ereditaria. Questo consente di studiare contemporaneamente un maggior numero di geni potenzialmente associati a neuropatia e di aumentare quindi la resa diagnostica.

HMN:

Queste neuropatie sono caratterizzate da una progressiva ipostenia e atrofia muscolare di natura neurogena, in assenza di deficit sensitivi. Se ne riconoscono diverse tipologie in base al quadro clinico e genetico; sono più comunemente a trasmissione autosomica dominante o autosomica recessiva. Esiste un gruppo di neuropatie definite dHMN (Neuropatie ereditarie motorie distali), che assumono caratteristiche cliniche a metà tra una CMT puramente motoria e un'Atrofia Muscolare Spinale con coinvolgimento distale.¹

HSAN:

Le HSAN sono un gruppo di neuropatie molto meno frequenti delle CMT e clinicamente e geneticamente eterogenee. Sono causate da una degenerazione dei neuroni ganglionari sensitivi ed autonomici paravertebrali simpatici e clinicamente si presentano con insensibilità al dolore nocicettivo con ipo-anestesia termodolorifica, dolore neuropatico spontaneo e deficit autonomici di vario tipo (xeroftalmia, turbe pupillari, turbe vasomotorie, turbe gastrointestinali e della sudorazione).¹

Vengono classificate sulla base dell'età di insorgenza e del tipo di trasmissione (autosomica dominante o recessiva) in cinque principali forme.

Le indagini genetiche sono fondamentali anche per indagare tutte quelle forme di neuropatie ereditarie associate a quadri clinici più complessi o addirittura multisistemici, come per esempio nel caso della CANVAS (*Cerebellar Ataxia, Neuropathy, Vestibular Areflexia Syndrome*), o dell'Amiloidosi Familiare, dovuta solitamente a mutazione del gene della transtiretina, o di malattie metaboliche

come la malattia di Fabry, di cui si parlerà in maniera approfondita più avanti.

Biopsia di nervo periferico

La biopsia di nervo, soprattutto in tempi passati, ha avuto un ruolo molto importante nella diagnosi delle neuropatie periferiche, ma l'avvento di indagini alternative altrettanto precise e meno invasive, come per esempio i test di genetica molecolare o i test immunochimici, ha fatto sì che il ricorso alla biopsia di nervo periferico si sia progressivamente ridotto.¹ Inoltre, nelle neuropatie delle piccole fibre è possibile sostituire la biopsia di nervo con la biopsia di cute, soprattutto quando l'elettrofisiologia del nervo surale (che rappresenta la principale sede di biopsia nervosa) fornisce risultati normali.¹

Lo scopo della biopsia nervosa è la caratterizzazione eziologica della neuropatia. Per minimizzare quanto possibile l'invasività operatoria e il deficit post-biottico, la scelta del nervo da biopsiare ricade su piccoli nervi sensitivi superficiali, come il nervo surale.⁴² Il prelievo del nervo surale avviene nel punto in cui il nervo decorre in posizione paramediana nella porzione distale esterna della gamba, dopo essere emerso dal congiungimento di due rami provenienti dal peroneo profondo e dal tibiale. Per identificare correttamente la sede di incisione sarebbe opportuno eseguire un'ecografia ricercando la vena safena, dal momento che il nervo le scorre accanto. Dopo di che si effettua un'incisione di circa 5-6 cm nella parte infero-esterna del polpaccio, si isola il nervo e lo si seziona, prelevandone un campione di 3-4 cm, e infine si suturano i lembi operatori. Una sede alternativa di prelievo può essere, più

distalmente, al di sopra del malleolo esterno.¹ L'intervento viene eseguito in anestesia locale.

Gli esiti post-bioplastici sono rappresentati nel 93% dei casi da un'ipoanestesia superficiale circoscritta ad un'area cutanea postero-laterale del piede, nel 19% dei casi da disestesie e nel 33% dei casi da dolore di modesta entità che si risolve insieme al deficit sensitivo in circa 12-18 mesi, ossia nel momento in cui si completa l'innervazione collaterale.⁴³

Le indicazioni alla biopsia di nervo surale si sono progressivamente ridotte nel corso degli anni e attualmente la biopsia viene effettuata nel sospetto di vasculite, soprattutto se sembra trattarsi di una vasculite isolata del SNP, o di patologie infiltrative, come in caso di infiltrazione linfomatosa o di amiloidosi. Nel caso dell'amiloidosi, per esempio, la colorazione Rosso Congo può consentire di evidenziare eventuali depositi di amiloide, caratterizzati da una tipica birifrangenza verde mela al microscopio a luce polarizzata.⁴⁴

Biopsia di cute

Dal momento che le tecniche neurofisiologiche convenzionali non consentono di valutare l'integrità delle fibre nervose di piccolo calibro A δ e C, nel sospetto di neuropatia delle piccole fibre è indicata l'esecuzione di una biopsia di cute.^{45,46}

La tecnica prende il nome di *Punch Biopsy* e si effettua solitamente in anestesia locale con lidocaina utilizzando un punzone cilindrico cavo con bordo tagliente (*punch*), del diametro di 3 mm. Solitamente si asporta un campione di cute cilindrico dello spessore di 3-4mm in corrispondenza della superficie laterale della coscia (circa 15-20 cm sotto la cresta iliaca) e della gamba (circa 10-15 cm

sopra il malleolo esterno). La ferita che residua dalla biopsia non necessita di sutura e si tratta di una metodica minimamente invasiva e ripetibile nel tempo in caso di necessità.¹

Prelevato il campione lo si sottopone a fissazione e criosezionamento e poi si procede alla marcatura immunoistochimica degli assoni (utilizzando anticorpi primari diretti contro il marcatore pan-neuronale *Protein Gene Product 9.5* e specifici anticorpi secondari) per studiarli con la microscopia ottica o con l'immunofluorescenza.¹

Viene quindi valutata la densità di fibre nervose intraepidermiche (IENFD) contando il numero di fibre che attraversano la giunzione tra derma ed epidermide e dividendo tale numero per la superficie della giunzione dermoepidermica stessa. La IENFD viene quindi confrontata con valori normali in base a sesso ed età del paziente e, in caso di riduzione al di sotto del quinto percentile, in presenza di un quadro clinico compatibile è possibile diagnosticare una neuropatia delle piccole fibre. Il confronto tra il valore di IENFD prossimale (coscia) e distale (gamba) consente inoltre di discriminare una neuropatia delle piccole fibre lunghezza-dipendente (IENFD ridotta solo a livello della gamba) da una neuropatia delle piccole fibre non-lunghezza-dipendente o ganglionopatia (IENFD ridotta sia a livello della gamba che a livello della coscia).

La valutazione quantitativa dell'innervazione intradermica è una procedura complessa che richiede l'uso di tecniche di analisi d'immagine e procedure standard⁴⁶ e si giova della correlazione con i dati psicofisici ottenuti nello stesso soggetto mediante l'esame quantitativo computerizzato della sensibilità termica (QST, Quantitative Sensory Testing).¹

Valutazione funzionale del Sistema Nervoso Autonomo

Alcune neuropatie, soprattutto le neuropatie autonome ereditarie, le neuropatie delle piccole fibre e alcune polineuropatie assonali idiopatiche croniche, coinvolgono il Sistema Nervoso Autonomo (SNA). Il dominio di funzioni che dipendono dal SNA è estremamente vasto, è quindi utile indagare singolarmente i diversi sistemi anatomico-funzionali regolati dal SNA, ricercando per ogni sistema i più frequenti sintomi di disautonomia.¹

Sistema	Metodiche d'indagine
Sistema oculare	<ul style="list-style-type: none"> ○ Test pupillari ○ Test di Schirmer
Sistema sudoriparo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Regolazione centrale: incremento di 1°C della T corporea interna, variazione circadiana della T corporea interna, Valutazione del volume urinario e della secrezione di Na⁺ e K⁺ ○ Regolazione periferica: test di stimolazione termica, test quantitativi dopo stimolazione colinergica cutanea, Sudoscan
Sistema respiratorio	<ul style="list-style-type: none"> ○ Polisonnografia con ossimetria ○ Laringoscopia diretta o indiretta

Sistema gastrointestinale	<ul style="list-style-type: none"> ○ Endoscopia ○ Svuotamento gastrico ○ Motilità gastroenterica
Sistema urogenitale	<ul style="list-style-type: none"> ○ Studio urodinamico ○ EMG del piano perineale ○ Erezione peniena nel sonno
Sistema cardiovascolare	<ul style="list-style-type: none"> ○ Test fisiologici: test ortostatico passivo, test ortostatico attivo, manovra di Valsalva, stimoli pressori, variazioni della frequenza cardiaca, massaggio del seno carotideo ○ Test biochimici: dosaggio della noradrenalina (NA) plasmatica in posizione supina e dopo tilt test ○ Test farmacologici: infusione di NA, infusione di isoproterenolo, infusione di atropina, infusione di tiramina

Tabella 4 – Metodiche d'indagine del SNA in funzione dei vari sistemi anatomico-funzionali, sul modello di P. Cortelli in Loeb, C. & Favale, E. *Neurologia di Fazio Loeb* (Società Editrice Universo; 2003).¹

Oltre alle metodiche di indagine riportate in tabella, molte delle quali è difficile che vengano applicate nello studio di una neuropatia

periferica, è possibile sottoporre ai pazienti dei test formulati a quiz, che analizzino l'impatto che la disautonomia ha sulla qualità di vita del paziente e sulla sua vita di relazione, come i questionari CADT (*Compound Autonomic Dysfunction Test*) o COMPASS-31 (*Composite Autonomic Symptom Score-31 Questionnaire*).

1.3 Le neuropatie ereditarie sensitive ad esordio tardivo

1.3.1 GENERALITA'

Cambiamenti associati all'età nel Sistema Nervoso Periferico

Il Sistema Nervoso Periferico è soggetto a cambiamenti nel corso del processo di invecchiamento. E' stato dimostrato che con l'aumentare dell'età aumenta il numero di fibre anormali con segni di degenerazione simil-walleriana, demielinizzazione segmentale o anomalie della distanza internodale.⁴⁷ E' stato anche dimostrato che per ogni decennio di vita il numero di neuroni simpatici nel midollo spinale diminuisce di circa l'8%.⁴⁸ I riflessi osteo-tendinei diminuiscono con l'età, soprattutto agli arti inferiori, con enfasi distale; ad esempio, il riflesso achilleo risulta non elicetabile nel 38% delle persone di età superiore ai 65 anni e i riflessi degli arti superiori sono invece assenti nel 5% dei pazienti anziani.⁴⁹ Anche la sensazione tattile mostra una soglia sempre più alta con l'età e la propriocezione ne risente, a causa di una riduzione dei meccanorecettori a livello di cute e articolazioni.^{50,51}

Un ridotto senso di vibrazione, quindi un deficit nella pallestesia, in particolare distale alle gambe, è stato dimostrato nel 71% di un gruppo di pazienti anziani sani.⁴⁹ Inoltre, questi processi di invecchiamento del SNP portano ad una perdita di forza muscolare ed equilibrio, associati anche a una perdita della massa muscolare (sarcopenia). Questa interazione di fattori neuronali e muscolari come causa di debolezza muscolare in età avanzata viene descritto in letteratura con il termine “dinapenia”.⁵²

Le polineuropatie nell’anziano hanno un importante impatto sulle attività quotidiane, sull’autosufficienza e sul rischio di caduta.^{53,54}

Epidemiologia

L'incidenza di polineuropatia aumenta significativamente con l'età. Un'ampia metanalisi ha rivelato una prevalenza dell'1% per la popolazione generale, che sale al 3% nella popolazione che abbia più di 55 anni e al 7% nella popolazione più anziana.⁵⁵

Una caratteristica tipica dell’età avanzata è l'alta percentuale di neuropatie senza una chiara eziologia. Anche in età avanzata le cause di neuropatia sono molteplici: cause metaboliche, immuno-mediate, ereditarie, tossiche, infettive e malattie multisistemiche che abbiano tra le loro manifestazioni una polineuropatia. Le neuropatie dell’anziano che non abbiano una causa chiara vengono definite neuropatie criptogeniche o idiopatiche croniche.

Nel paziente anziano, quando si diagnostica una neuropatia sensitiva, non si devono trascurare le diagnosi differenziali di natura ortopedica. Alcune patologie di natura ortopedica come l'artrosi o l'alluce valgo possono simulare l'andatura instabile della neuropatia.⁵³

A questo scopo possono esserci utili gli esami elettrofisiologici, anche se va sempre tenuto a mente che nell'anziano, anche sano, cambiano gli standard fisiologici e quindi i valori di controllo non corrisponderanno a quelli di un giovane adulto. In particolare, le ampiezze dei potenziali sensitivi e motori diminuiscono.^{56,57}

Dato che la diagnosi di neuropatia assonale, la più frequente in età avanzata, si basa sulla riduzione delle ampiezze di questi potenziali, l'oggettivazione elettrofisiologica di una polineuropatia nell'anziano può essere difficile.

Polineuropatia Assonale Idiopatica Cronica (CIAP)

La CIAP è la neuropatia più comune in età avanzata. Dal punto di vista clinico, è definita da una clinica relativamente lieve e a progressione molto lenta, soprattutto sotto forma di disturbi sensitivi distali alle gambe, lieve atassia sensitiva e dolore neuropatico.⁵⁸ La paresi è assente, per definizione è ammessa solo una leggera paresi degli estensori delle dita dei piedi. Elettrofisiologicamente, è una neuropatia assonale.

Per poter porre diagnosi di CIAP devono essere escluse le cause note di neuropatia, come fattori metabolici, tossici e sistemici. Si è visto che spesso la CIAP si associa a sindrome metabolica⁵⁹ e questo potrebbe essere uno spunto per un approccio terapeutico.

CIAP con substrato genetico ereditario

Circa la metà dei pazienti neuropatici che abbiano più di 65 anni di età non ha una diagnosi certa, ma ha una neuropatia assonale definita come CIAP.⁶⁰

Molto spesso alla base di una CIAP sembra esserci una neuropatia ereditaria; pertanto, sono molto utili gli strumenti diagnostici genetici di sequenziamento di nuova generazione (NGS), come il sequenziamento dell'intero esoma (WES). Già nel 2020 Senderek et al.⁶¹ hanno identificato una probabile causa genetica di neuropatia nel 18% dei pazienti in una coorte di 230 individui con CIAP in cui i sintomi sono iniziati dopo i 35 anni di età.

Questo rafforza il punto che una percentuale significativa di CIAP è probabilmente causata da alterazioni genetiche in una popolazione che invecchia. Mentre la maggior parte delle neuropatie demielinizzanti ereditarie si presenta nelle prime decadi di vita, questo non è il caso di un numero crescente di neuropatie ereditarie assonali. Un esempio recente sono le espansioni introniche bialleliche nel gene *RFC1*, che causano una Sindrome caratterizzata da Atassia cerebellare, Neuropatia sensitiva e Areflessia Vestibolare (CANVAS).⁶² La maggior parte dei pazienti con CANVAS presenta infatti, nelle fasi iniziali di malattia, una neuropatia sensitiva isolata. Complessivamente, il 50% dei pazienti con presunte neuropatie assonali ereditarie non ha ancora la causa genetica identificata anche con WES o altri approcci NGS. Poiché la prevalenza di neuropatia periferica nei pazienti di età > 65 anni si avvicina al 10%, sembra probabile che un certo numero di questi casi alla fine si scoprirà essere su base genetica.⁶⁰

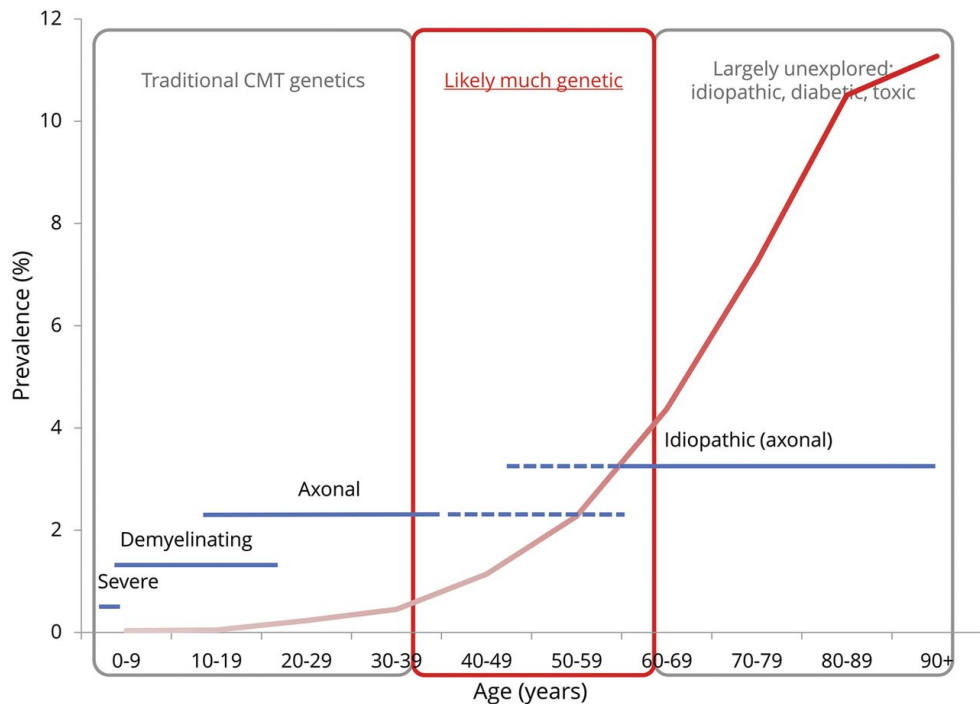


Figura 2 – La prevalenza delle neuropatie assionali idiopatiche croniche con una causa genetica alla base aumenta con l'età, soprattutto dopo i 60 anni d'età. Tratta da Hoffman et al. *Impairments and comorbidities of polyneuropathy revealed by population-based analyses*.⁶³

Identificare potenziali cause genetiche di CIAP non è così semplice, perché è difficile avere la certezza che una variante identificata stia effettivamente causando la malattia. Inoltre, spesso le CIAP si verificano in pazienti singoli o in piccole famiglie, a differenza per esempio delle CMT, che tendono a coinvolgere diversi soggetti all'interno di grandi famiglie. Le tecniche NGS, tra cui il WES e il sequenziamento dell'intero genoma, sono strumenti potenti che hanno reso possibile la diagnosi genetica di piccole famiglie. Tuttavia, richiedono un attento filtraggio per eliminare le varianti benigne e, anche in questo caso, si rimane con le famigerate varianti di significato incerto, che affliggono molti di noi

nell'interpretazione dei risultati dei test.⁶⁰ L'American College of Medical Genetics ci fornisce delle linee guida per l'interpretazione delle varianti, in cui la segregazione della neuropatia in una famiglia e la prevalenza della variante nella popolazione generale sono componenti importanti.⁶⁴

Sfortunatamente non esistono trattamenti specifici per le CIAP, ma il trattamento sintomatico e la gestione fisica dovrebbero essere intrapresi per prevenire la deformità del piede o le ulcere cutanee di cui possono soffrire questi pazienti.⁶⁵ È fondamentale ricordarsi per questi pazienti che il confine tra la normale funzione dei nervi periferici e la neuropatia periferica non è sempre distinto, e questo è particolarmente vero per i pazienti più anziani.⁶⁶ Inoltre, se i pazienti con sospetta CIAP mostrano sintomi progressivi, deve essere condotta un'ulteriore valutazione per escludere altre cause più definite.⁶⁵

1.3.2 CANVAS (Cerebellar Ataxia with Neuropathy and Vestibular Areflexia Syndrome)

Generalità

Il termine CANVAS (*Cerebellar Ataxia with Neuropathy and Vestibular Areflexia Syndrome*) nasce nel 2011 come acronimo per definire una sindrome neurologica caratterizzata prevalentemente da coinvolgimento del nervo periferico, cerebellare e vestibolare, elementi portanti della regolazione dell'equilibrio.

Si tratta di una patologia geneticamente determinata, con modalità di trasmissione autosomica recessiva, e solo nel 2019 è stato possibile individuare la mutazione responsabile della malattia: un'espansione biallelica intronica (introne 2) della ripetizione AAGGG nel gene *RFC1* (*Replication Factor Complex Subunit 1*) avente come locus genico la regione 4p14.⁶²

L'insorgenza dei sintomi è piuttosto tardiva, quinta-sesta decade d'età.

La prevalenza stimata del disturbo CANVAS/spettro *RFC1* varia tra 1 su 20.000 e 1 su 625 individui.⁶⁷

Sebbene i primi studi descrissero nella CANVAS una prominente deplezione di grandi fibre mielinizzate, probabilmente esiste anche un grave coinvolgimento delle piccole fibre nervose che influisce sulla qualità di vita dei pazienti.^{68,69}

Caratteristiche cliniche

Questa patologia coinvolge diversi domini funzionali, i pazienti possono infatti presentarsi con:

- a. Compromissione cerebellare e quindi atassia, disturbi dell'equilibrio e della coordinazione ma anche disartria e disfagia, nistagmo o scomposizione delle saccadi
- b. Neuropatia sensitiva con instabilità, perdita della sensibilità, formicolii, dolori e crampi e all'esame obiettivo positività del segno di Romberg; sembra trattarsi di una neuronopatia con coinvolgimento dei corpi neuronali a livello dei gangli delle radici nervose dorsali ma anche di alcuni nervi cranici, come il trigemino
- c. Areflessia vestibolare bilaterale con oscillopsia
- d. Tosse stizzosa cronica nei decenni precedenti all'insorgenza dei sintomi neurologici

- e. Compromissione autonoma con ipotensione posturale, disfunzione erettile, disfunzione urinaria, stipsi/alvo diarroico, alterato transito gastro-intestinale con precoce ripienezza post-prandiale, nausea, vomito o gonfiore, sudorazione alterata, xeroftalmia e xerostomia

Normalmente la neuropatia nel contesto di CANVAS è solo sensitiva e non determina deficit di forza o di trofismo muscolare.⁶⁷

Caratteristica clinica	Frequenza di presentazione
Neuropatia sensitiva	100%
Coinvolgimento vestibolare bilaterale	69% (93% se testati)
Tosse cronica	64%
Atassia cerebellare + neuropatia + areflessia vestibolare	63%
Sindrome cerebellare	63%
Disautonomia	32% (50% se eseguiti test specifici)

Tabella 5 – Frequenza di alcune caratteristiche cliniche in 100 pazienti con mutazione su *RFC1*, secondo lo studio di Cortese et al. *Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome due to RFC1 repeat expansion*. Brain 143:480–90 (2020).⁷⁰

Indagini diagnostiche

La CANVAS deve essere sospettata in individui con insorgenza, dopo i 35 anni, di uno o più dei segni clinici sopra citati, con risultati elettrodiagnostici, vestibolari e di imaging compatibili ed

eventualmente anche in presenza di una storia familiare indicativa. Questi sono tutti criteri di supporto all'indagine definitiva che ci permette di fare diagnosi certa di malattia, ossia il test genetico molecolare. Trattandosi di una patologia a trasmissione autosomica recessiva, una storia familiare negativa non esclude la diagnosi.

REPERTI ELETTRODIAGNOSTICI:

Sono indicativi tutti quei reperti coerenti con una neuropatia sensitiva o neuronopatia, quindi:

- Potenziale d'Azione Sensitivo (SAP) di ampiezza ridotta o non registrabile
- Studio delle velocità di conduzione nervosa motorie di solito normale
- Riflesso dell'ammicciamento (*Blink reflex*) alterato, riflesso H solitamente conservato (per verosimile risparmio delle fibre IA che innervano i fusi neuromuscolari)
- Elettromiografia normale⁷¹

TEST VESTIBOLARE:

- *Video head impulse test* anomalo bilateralmente
- Risposta calorica ridotta bilateralmente
- Riflesso vestibolo-oculare testato con sedia rotante alterato bilateralmente⁷¹

IMAGING:

- La risonanza magnetica cerebrale mostra spesso atrofia cerebellare (soprattutto atrofia vermiana)

- La risonanza magnetica della colonna vertebrale può dimostrare atrofia del midollo e iperintensità nelle sequenze pesate in T2 nelle colonne posteriori
- L'ecografia di nervo mostra una riduzione dell'area della sezione trasversale dei nervi degli arti superiori e inferiori⁷¹

TEST DI GENETICA MOLECOLARE:

Per confermare la diagnosi è necessario eseguire un test genetico molecolare che dimostri la presenza di espansioni bialleliche del pentanucleotide intronico AAGGG nel gene *RFC1*.

Il rilevamento di un'espansione della ripetizione pentanucleotidica AAGGG può essere effettuato mediante reazione a catena polimerasica (PCR) convenzionale e *repeated prime-PCR* (RP-PCR), seguita dalla conferma della presenza di espansioni bialleliche e delle loro dimensioni mediante *Southern blotting*.

Altre tecniche, tra cui il *long read sequencing*⁷² potrebbero essere un buon metodo per valutare in modo affidabile la presenza, le dimensioni e la sequenza delle espansioni ripetute in *RFC1*.⁶⁷

1.3.3 AMILOIDOSI EREDITARIA DA TRANSTIRETINA

Generalità

La polineuropatia amiloidosica familiare, chiamata anche amiloidosi ereditaria correlata alla transtiretina, è una polineuropatia autosomica dominante che insorge in età adulta. Esistono forme ad esordio precoce, con esordio intorno alla terza-quarta decade di vita, e forme ad esordio tardivo, con esordio intorno ai 60 anni di età.⁵³ La malattia insorge a causa della mutazione del gene

codificante per la proteina transtiretina, che si trova sul cromosoma 18q11.2-12.1.3. Si tratta di una proteina coinvolta nel trasporto del retinolo e della tiroxina. Viene sintetizzata principalmente dal fegato, ma anche da epitelio ciliato retinico e plessi corioidei. Ad oggi sono state identificate 140 diverse mutazioni sulla transtiretina e in genere si tratta di mutazioni missenso che destrutturano la transtiretina nativa e favoriscono la dissociazione del tetramero in monomeri, che poi vanno incontro a ripiegamenti errati e si auto-assemblano in fibrille amiloidi che poi tendono a depositarsi, determinando un coinvolgimento clinico multisistemico.⁷³ La mutazione più frequente, soprattutto nelle aree endemiche, è la sostituzione di una metionina con una valina in posizione 30 (*ATTRVal30Met*), che causa il classico fenotipo neuropatico e cardiaco di malattia.

Caratteristiche cliniche

Le sedi più colpite sono il nervo periferico e il cuore, dove tendono ad accumularsi in zona extracellulare gli aggregati insolubili di fibrille amiloidi. Le caratteristiche cliniche differiscono in base al tipo di mutazione: endemica o non endemica. Gli individui con la mutazione *ATTRVal30Met* che vivono in regioni endemiche mostrano la presentazione classica, con insorgenza precoce di neuropatia nella terza o quarta decade di vita e prominente coinvolgimento delle fibre nervose di piccolo calibro mieliniche e non mieliniche.

NEUROPATIA:

I pazienti generalmente presentano una neuropatia assonale con deficit sensitivo distale, con dolore e anomalie nella percezione termica. Con il tempo vengono poi coinvolte anche le fibre sensitive

e motorie più grandi, con compromissione della pallestesia e della propriocezione, fino ad avere ipostenia distale con progressione in senso disto-prossimale.^{74,75}

Essendo coinvolte anche le piccole fibre, i pazienti possono presentare anche disfunzioni autonome che coinvolgano il sistema cardiovascolare, gastro-intestinale e genito-urinario. Ci possono essere manifestazioni quali xerostomia e xeroftalmia, ipotensione ortostatica, diarrea alternata a stipsi, disfunzione erettile.⁷⁶

ALTRE MANIFESTAZIONI:

Oltre ai nervi periferici e ai gangli dorsali, i depositi di amiloide si trovano anche nei reni, nel cuore, nel tratto gastro-intestinale, a livello del vitreo, nelle leptomeningi e nei vasi sanguigni. I difetti di conduzione cardiaca e la cardiomiopatia possono anche causare aritmie pericolose per la vita. A livello renale i pazienti possono avere un'insufficienza renale con proteinuria; a livello oculare ci può essere deposizione di amiloide vitreale.

La sopravvivenza media in assenza di terapia è inferiore a 10 anni dalla diagnosi a causa soprattutto dell'insufficienza cardiaca.^{77,78,79}

Possono verificarsi anche presentazioni atipiche di neuropatia amiloidosica familiare, che possono determinare un ritardo diagnostico. I pazienti possono presentare infatti l'insorgenza di neuropatia dell'arto superiore con sintomi sensoriali predominanti, e sintomi agli arti inferiori che si sviluppano fino a 2 anni dopo.⁸⁰

Indagini diagnostiche

Nei pazienti con anamnesi familiare di neuropatia, l'amiloidosi ereditaria deve essere presa in considerazione nelle presentazioni di polineuropatia sensitivo-motoria con o senza disfunzione autonoma, soprattutto se associata a cardiomiopatia. I test genetici hanno sostituito la necessità di biopsia di nervo in questi pazienti. Tuttavia, essere portatori di mutazioni non conferisce necessariamente una malattia clinica, a causa della penetranza variabile. Sebbene i test genetici spesso non vengano eseguiti nella batteria iniziale di test, data la disponibilità di nuovi trattamenti per l'amiloidosi ereditaria da mutazione della transtiretina, andrebbe preso in considerazione di eseguire i test genetici all'inizio del percorso diagnostico.⁷⁶

Gli Studi sulla Conduzione Nervosa (NCS) e l'elettromiografia (EMG) dimostrano una neuropatia prevalentemente assonale con possibile demielinizzazione secondaria. I potenziali d'azione nervosi sensitivi sono spesso colpiti per primi e in modo più grave rispetto ai potenziali d'azione muscolari composti (CMAP), con ampiezza ridotta o potenziali assenti. Successivamente, anche i CMAP diminuiscono in ampiezza o diventano non registrabili.⁷⁶ Uno NCS normale non esclude però un coinvolgimento delle fibre nervose di piccolo calibro, che non vengono valutate con gli studi neurofisiologici convenzionali. Nei pazienti con NCS/EMG normale, infatti, i test per la valutazione delle funzioni autonome, come il test quantitativo del riflesso assonale sudomotorio (QSART), possono identificare il coinvolgimento di piccole fibre. La biopsia cutanea può rivelare una ridotta densità delle fibre nervose intraepidermiche (IENFD) e la deposizione di amiloide.⁸¹

Nei pazienti portatori pre-sintomatici è possibile che alcuni test eseguiti sulle piccole fibre identifichino una neuropatia precoce.⁸²

Nei casi in cui la diagnosi rimanga poco chiara dopo test non invasivi, può essere presa in considerazione la biopsia di nervo, che può dimostrare depositi di amiloide nel tessuto connettivo endoneurale ed epineurale e depositi nelle pareti dei vasi sanguigni endoneurali ed epineurali. Data la deposizione a chiazze, non uniforme, con degenerazione delle fibre distali dovuta a depositi di amiloide, una biopsia del nervo surale negativa per l'amiloide non esclude la diagnosi.^{83,84}

La risonanza magnetica può essere utile in quanto può rilevare alterazioni di segnale a carico del nervo surale anche nei portatori asintomatici. In uno studio, utilizzando sequenze pesate in T2 e in densità protonica, è stato possibile differenziare in modo affidabile tra pazienti con hATTR, portatori presintomatici *TTR* mutati e controlli sani. Questo rappresenta potenzialmente un metodo non invasivo per rilevare precocemente la neuropatia nei portatori asintomatici.⁷⁸

Terapia

Le attuali opzioni terapeutiche comprendono farmaci stabilizzanti della transtiretina, come *tafamidis*, che impediscono la dissociazione del tetramero nei monomeri da cui ha origine il processo amiloidogenico, e farmaci che interferiscono selettivamente a livello dell'mRNA della transtiretina, ossia i silenziatori genici *patisiran*, *vutrisiran* e *inotersen*. Lo scopo di queste terapie è di prevenire la deposizione di amiloide nei tessuti. *Patisiran* e *vutrisiran* sono degli *small interfering RNA* (siRNA), mentre *inotersen* è un oligonucleotide antisenso. Tutti questi farmaci determinano una degradazione dell'mRNA della transtiretina a livello epatico e rendono conto di una significativa riduzione dei livelli sierici di proteine TTR.⁸⁵

2. Razionale e scopo dello studio

Ad oggi non esistono metodiche neurofisiologiche affidabili per studiare le fibre nervose di piccolo calibro (PF). Recentemente abbiamo sviluppato un test neurofisiologico innovativo per valutare la funzione delle PF: l'utilizzo di un nuovo elettrodo con un peculiare *micropattern* interdigitato, capace di stimolare selettivamente le terminazioni nervose intraepidermiche e studiare in questo modo i Potenziali Evocati Nocicettivi. Nei pazienti con CANVAS mancano studi che abbiamo misurato la funzione delle PF.

Le metodiche attualmente proposte in letteratura per lo studio delle PF non sembrano infatti essere ottimali, ne è un esempio lo studio tramite potenziali evocati laser, che presenta limiti e complicanze quali rischio di ustioni e dubbia capacità di stimolare selettivamente le piccole fibre cutanee.

Per ovviare al problema della stimolazione selettiva, è stato recentemente sviluppato un nuovo elettrodo con un *micropattern* interdigitato unico, che consente la stimolazione selettiva dell'epidermide, innervata esclusivamente da fibre nervose di piccolo calibro. Usando questo elettrodo, l'attivazione selettiva delle fibre nervose intraepidermiche è garantita dalla particolare disposizione delle guide conduttive: queste sono poste a una distanza fra loro di 150 micrometri e sono connesse alteratamente ai poli opposti dello stimolatore. Questa piccola distanza tra catodo ed anodo consente una ridotta profondità di penetrazione dello stimolo elettrico nella cute (inferiore a 100 micrometri).⁸⁶

Abbiamo pertanto applicato questa metodica a pazienti affetti da CANVAS ove la compromissione delle PF è ancora in corso di studio e deve essere dimostrata.

Il razionale che suggerisce di studiare le piccole fibre nella CANVAS si basa sulla evidenza di un loro importante coinvolgimento,

possibilmente spiegato clinicamente dalla presenza di sintomi disautonomici.⁸⁷ Quando inizialmente si è scoperta l'espansione biallelica in *RFC1* come causa responsabile della CANVAS⁶², sembrava esserci un interessamento esclusivo o comunque preponderante delle fibre di maggior calibro. In realtà, recentemente è stato dimostrato un importante coinvolgimento anche delle fibre di piccolo calibro, che potrebbe essere appunto responsabile dei sintomi autonomici, che sono molto importanti e invalidanti in questi pazienti, dell'ipoestesia termica, talvolta presente, e del dolore neuropatico, di nuovo molto frequente in questi pazienti. Anche la tosse secca stizzosa, che è un sintomo tipicamente riportato dai pazienti con CANVAS, potrebbe essere giustificata dal coinvolgimento delle fibre nervose di piccolo calibro che innervano l'esofago e le vie aeree superiori; potrebbe quindi trattarsi di una sorta di ipereccitabilità da denervazione.⁸⁸

Da un punto di vista anatomico/morfologico, il deficit di piccole fibre nervose nei pazienti CANVAS è già stato dimostrato attraverso la biopsia di cute a livello di coscia e gamba: uno studio, infatti, ha dimostrato una perdita quasi completa delle fibre nervose intraepidermiche e una diminuzione significativa dei plessi nervosi subepidermici in tutti i pazienti CANVAS presi in considerazione.⁸⁹ Ancora nessuno studio neurofisiologico si è però dimostrato in grado di studiare la fisiologia del deficit di fibre nervose di piccolo calibro nei pazienti con espansione biallelica in *RFC1*.

Pertanto, lo scopo di questo studio è quello di valutare il coinvolgimento delle fibre nervose di piccolo calibro mieliniche (fibre A δ) nei pazienti con espansione intronica biallelica in *RFC1* compatibile con la diagnosi di CANVAS (*Cerebellar Ataxia with Neuropathy and Vestibular Areflexia Syndrome*), utilizzando una metodica neurofisiologica innovativa, ossia lo studio dei Potenziali Evocati Nocicettivi ottenuti dopo stimolazione con il nuovo elettrodo interdigitato.⁹⁰

3. Materiali e metodi

3.1 Popolazione studiata

Sono stati studiati quattro gruppi di soggetti:

1. Soggetti con malattia correlata a *RFC1*;
2. Individui sani;
3. Soggetti affetti da ATTRv (Amiloidosi Familiare da mutazione della transtiretina) con polineuropatia;
4. Portatori presintomatici di ATTRv.

3.1.1 CRITERI DI INCLUSIONE E DI ESCLUSIONE

I principali criteri di inclusione che abbiamo preso in considerazione sono stati:

1. Per quanto riguarda i soggetti con ATTRv, i portatori presintomatici di ATTRv e i pazienti con malattia correlata a *RFC1*, era necessaria una diagnosi genetica molecolare confermata
2. I portatori di ATTRv sono stati considerati presintomatici in caso di:
 - a. Assenza di sintomi sensitivi o vegetativi (punteggio Lauria 1)⁹¹
 - b. Esame neurologico normale con un *Neuropathy Impairment Score* (NIS) di 0-1
 - c. Studio di conduzione nervosa nella norma
3. I soggetti sani di controllo non presentavano alcun sintomo di neuropatia periferica e mostravano un esame neurologico normale.

Sono stati invece esclusi i soggetti con altre cause o fattori di rischio per neuropatia periferica come diabete, carenza di vitamina B9 o B12, paraproteinemie, ipotiroidismo, infezione da HIV e consumo di alcol superiore a due unità alcoliche al giorno.

3.2 Valutazioni svolte in questo studio

3.2.1 RACCOLTA DELLE INFORMAZIONI ANAMNESTICHE E CLINICHE

In tutti i soggetti sono state raccolte informazioni riguardo: età, sesso, patologia genetica identificata, età all'insorgenza della malattia, durata della malattia e segni e sintomi clinici neurologici. Per i pazienti ATTRv presintomatici è stato inoltre calcolato il "time to PADO" (*Predicted Age of Disease Onset*), ossia il tempo mancante per l'inizio dei sintomi clinici o dei segni di coinvolgimento d'organo, basandosi sull'età media d'insorgenza dei sintomi presente in letteratura e sull'età media di esordio di malattia manifesta nei familiari affetti.

3.2.2 VALUTAZIONI IN SEDE DI ESAME NEUROLOGICO

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un esame neurologico di routine, ponendo particolare attenzione ai disturbi sensoriali. In sede di visita sono stati raccolti inoltre i dati necessari alla valutazione del Sistema Nervoso Autonomo, nell'ottica di evidenziare una sua eventuale compromissione.

Valutazione dei sintomi e segni autonomici

Per valutare i disturbi autonomici sono stati utilizzati sia criteri semplici, come quello della valutazione dell'ipotensione ortostatica, sia scale di valutazione specifiche per il coinvolgimento autonomico.

CADT:

CADT (Compound Autonomic Dysfunction Test) è una scala di valutazione di sintomi disautonomici che prevede un punteggio totale compreso tra 0 e 20 per i maschi e tra 0 e 16 per le femmine.⁹² I domini indagati da questo test sono l'ipotensione ortostatica, i sintomi gastro-intestinali, i sintomi urinari e la disfunzione erettile. Più alto è il punteggio finale, minore è la compromissione del Sistema Nervoso Autonomo.

Table 1 Compound Autonomic Dysfunction Test (CADT)

	4	3	2	1	0
Postural hypotension	No	Asymptomatic	Lipothymia	Postural syncope	Bedridden
Nausea preventing normal feeding, vomiting	No	Nausea/Slow digestion	Vomiting: Less than once a week	Vomiting: More than once a week	Vomiting: Daily
Diarrhea/Constipation	No	Once a month	Once a week	More than twice a week	Daily
Sphincter disturbances	No	Dysuria	Dysuria + episode of incontinence	Intermittent bladder catheterization	Permanent bladder catheterization
Erectile dysfunction	No	Difficulties	Impotency		
Total					

Figura 3 – Parametri considerati nel CADT.

Dal momento che il punteggio massimo ottenibile per gli individui di sesso femminile è di 16/20, non potendo valutare nel loro caso il parametro *erectile dysfunction*, per le analisi statistiche in questo studio il punteggio totale al CADT è stato considerato in percentuale, per ovviare al *bias* dovuto alla differenza di genere.

COMPASS-31:

COMPASS-31 (Composite Autonomic Symptom Score-31) è uno *score* che prevede un punteggio totale compreso tra 0 e 100, derivante dalla risposta del paziente a diverse domande inerenti alle funzioni autonome: funzionalità dell'apparato gastro-intestinale, xeroftalmia e xerostomia, ipotensione ortostatica, funzioni sfinteriche dell'apparato urinario, cambiamenti nella colorazione cutanea, disturbi visivi come problemi nell'accomodazione.⁹³

In questo caso, più è alto il punteggio totale, maggiore sarà la compromissione autonoma del paziente.

VALUTAZIONE DELL'IPOTENSIONE ORTOSTATICA:

Consiste nella misurazione della pressione arteriosa omerale a riposo in clinostatismo e 60 e 180 secondi dopo aver assunto la posizione eretta. Secondo la Società Europea di Cardiologia, l'ipotensione ortostatica è diagnosticabile se si sono verificate una o più delle seguenti situazioni: calo della pressione arteriosa sistolica ≥ 20 mmHg rispetto al basale, calo della pressione arteriosa diastolica di ≥ 10 mmHg rispetto al basale o pressione arteriosa sistolica ≤ 90 mmHg.⁹⁴

Valutazioni specifiche nei pazienti ATTRv

I soggetti con ATTRv con polineuropatia sono stati inoltre sottoposti a diversi test e questionari:

- Punteggio di disabilità della polineuropatia (PND), *Neuropathy Impairment Score* (NIS, 0-244) e *Neuropathy Impairment Score_Lower Limb* (NIS-LL, 0-88)

- Questionari sulla qualità di vita: *Short Form Health Survey 36 (SF-36)* e *Norfolk Quality of Life-Diabetic Neuropathy (QOL-DN)*
- *Karnofsky Performance Status* per la valutazione delle condizioni generali del paziente, indagando limitazione delle attività, cura di se stessi ed autodeterminazione

Valutazioni specifiche nei pazienti CANVAS

I soggetti con espansione biallelica intronica in *RFC1* e quindi manifestazioni di malattia compatibili con CANVAS, sono stati valutati seguendo due scale: CMTES e SARA.

SCALA DI VALUTAZIONE CMTES:

La CMTES (Charcot-Marie-Tooth Evaluation Score) è una scala che permette di valutare il grado di compromissione sia della componente motoria che della componente sensitiva, permette inoltre di valutare la forza, che però solitamente risulta non compromessa nei pazienti CANVAS.

Parameter	0	1	2	3	4
Sensory symptoms	None	Symptoms below or at ankle bones	Symptoms up to the distal half of the calf	Symptoms up to the proximal half of the calf, including knee	Symptoms above knee (above the top of the patella)
Motor symptoms (legs)	None	Trips, catches toes, slaps feet Shoe inserts	Ankle support or stabilization (AFOs) Foot surgery	Walking aids (cane, walker)	Wheelchair

Motor symptoms (arms)	None	Mild difficulty with buttons	Severe difficulty or unable to do buttons	Unable to cut most foods	Proximal weakness (affect movements involving the elbow and above)
Pinprick sensibility	Normal	Decreased below or at ankle bones	Decreased up to the distal half of the calf	Decreased up to the proximal half of the calf, including knee	Decreased above knee (above the top of the patella)
Vibration	Normal	Reduced at great toe	Reduced at ankle	Reduced at knee (tibial tuberosity)	Absent at knee and ankle
Strength (legs)	Normal	4+, 4, or 4- on foot dorsiflexion or plantar flexion	≤3 on foot dorsiflexion or ≤3 on foot plantar flexion	≤3 on foot dorsiflexion and ≤3 on plantar flexion	Proximal weakness
Strength (arms)	Normal	4+, 4, or 4- on intrinsic hand muscles	≤3 on intrinsic Hand muscles	≤5 on wrist extensors	Weak above elbow

Tabella 6 – Parametri valutati dalla scala CMTES.

Nel caso della CMTES, a un punteggio totale più alto corrisponde una maggiore compromissione clinica del paziente.

SCALA DI VALUTAZIONE SARA:

La SARA (Scale for Assessment and Rating of Ataxia) permette di valutare il grado di atassia, dismetria ed incoordinazione nel paziente CANVAS. In particolare, considera i parametri:

- *Gait*
- *Stance*

- *Sitting*
- *Speech disturbance*
- *Finger chase*
- *Nose-finger test*
- *Fast alternating hand movements*
- *Heel-shin slide*

Anche nel caso della scala SARA, più è alto il punteggio, maggiore sarà la compromissione del paziente.

3.2.3 VALUTAZIONI NEUROFISIOLOGICHE

Infine, tutti i soggetti sono stati sottoposti alla valutazione della conduttanza elettrochimica cutanea (ESC) mediante Sudoscan e alla registrazione dei Potenziali Evocati Dolore-Correlati (PREP) e dei Potenziali Evocati Nocicettivi (NEP).

I pazienti con neuropatia sono stati inoltre sottoposti ad uno studio convenzionale sulla conduzione nervosa (NCS).

3.2.4 RACCOLTA DEI DATI

Tutti i dati sono stati raccolti in un foglio di calcolo Excel.

3.3 Metodologie della Neurofisiologia

3.3.1 REGISTRAZIONE DI PREP E NEP

I soggetti sono stati sottoposti innanzitutto ad uno studio convenzionale della conduzione nervosa, per valutare la gravità del coinvolgimento delle grandi fibre nervose sensitive e motorie.

Sono stati raccolti nel foglio di calcolo Excel i valori di ampiezza e latenza del Potenziale d'Azione Sensitivo (SAP) radiale, registrato dopo la stimolazione antidromica del nervo radiale.

I soggetti sono stati sottoposti sia allo studio dei potenziali evocati somatosensitivi classici, stimolando le grandi fibre (nervo mediano e nervo radiale) con elettrodi a placca (Figura 4) e registrando le risposte a livello dello scalpo con una derivazione C3' o C4'/Fz, sia allo studio innovativo delle piccole fibre.

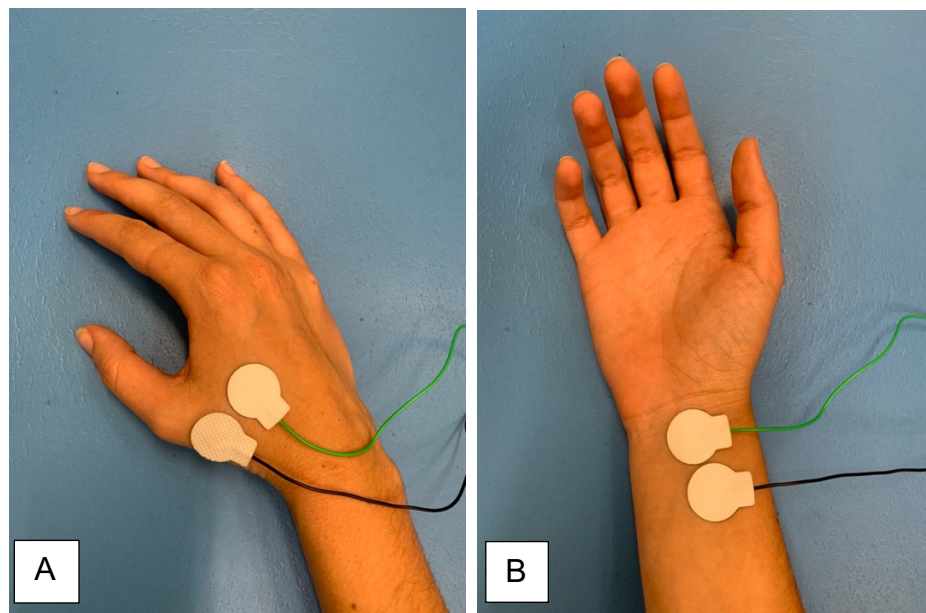


Figura 4 – Stimolazione del territorio cutaneo innervato del nervo radiale (A) e del nervo mediano (B) con elettrodi a placca, per valutare le fibre di grosso calibro.

Per valutare le piccole fibre A δ , è stato utilizzato il nuovo elettrodo interdigitato *micropatterned* (150 IDE). Questo elettrodo 150 IDE (nello specifico, 150 IDE flessibile 15x15 mm, Figura 5) è stato applicato sulla cute pelosa del dorso della mano, tra il primo e il secondo metacarpo, nel territorio di innervazione del nervo radiale, dopo aver sgrassato la pelle con etanolo in modo da ridurre la sudorazione, la quale potrebbe determinare una diminuzione dell'impedenza tra elettrodo e cute e quindi l'impossibilità del paziente di percepire l'impulso elettrico somministrato. Una volta posizionato l'elettrodo sulla cute, lo abbiamo fissato con nastro adesivo e non lo abbiamo più spostato, in modo da limitare il più possibile la stimolazione tattile.

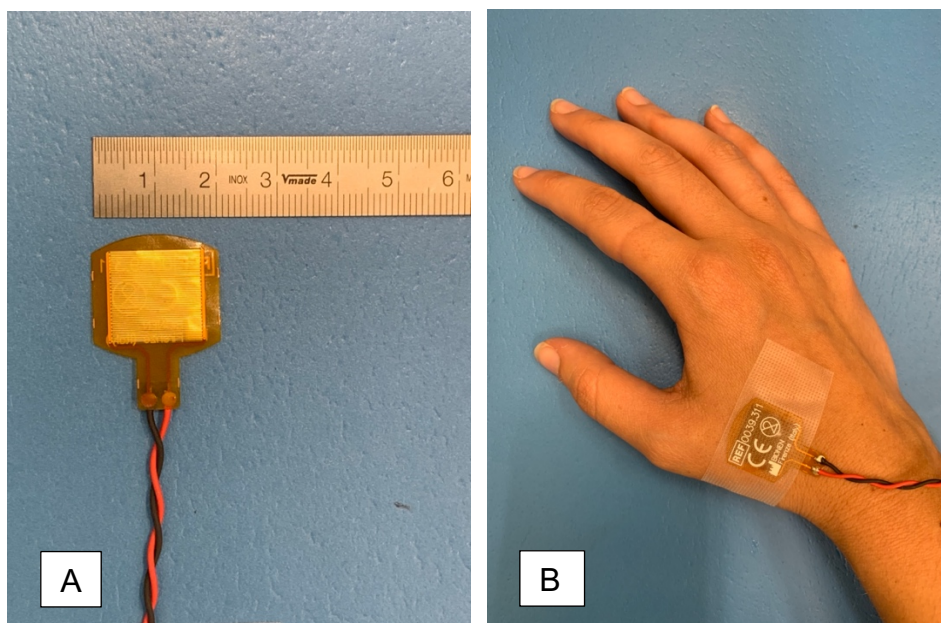


Figura 5 – Elettrodo 150 IDE *micropatterned* (A) e sede di stimolazione delle piccole fibre, sul territorio del nervo radiale (B).

Sono state svolte due diverse tipologie di stimolazione e registrazione con l'elettrodo *micropatterned* 150 IDE, ossia una stimolazione ritmica sostenuta ed una stimolazione a intervalli *random*. Le registrazioni ottenute dopo stimolazione a intervalli *random* vengono denominate PREP (Pain-Related Evoked Potentials), mentre le registrazioni continue, o ritmiche, vengono

denominate NEP (Nociceptive Evoked Potentials). In entrambi i casi sono stati utilizzati *burst* (“treni”) di dieci impulsi elettrici, della durata di 0,5 ms ciascuno con un periodo di 1 ms tra un impulso e l’altro. I treni sono stati generati da un generatore di forme d’onda arbitrarie TG2511 (Thurlby Thandar Instruments Ltd, Huntingdon, UK) che attiva uno stimolatore a corrente costante (DS7A, Digitimer Ltd, UK). Nel caso della stimolazione continua (NEP) è stata eseguita una stimolazione ripetitiva a una velocità di 0,83/s, con 500 medie, mandando al soggetto uno stimolo al secondo per 500 volte consecutive. Per la stimolazione random (PREP), invece, ogni soggetto è stato stimolato con un totale di 30 impulsi mandati a distanza variabile e casuale uno dall’altro; la distanza tra un impulso e l’altro stava in un arco di tempo tra 6 e 15 secondi. L’intensità della stimolazione era, per ogni soggetto analizzato, pari a 1,5 volte la soglia di percezione: la sensazione percepita dai pazienti era simile a quella di una puntura di spillo, sul punto di stimolazione e non irradiata altrove.

Ai partecipanti è stato chiesto di sdraiarsi supini in una posizione comoda e rilassata, tenere gli occhi chiusi e informare se notavano cambiamenti degni di nota nella loro percezione dello stimolo.

Dal momento che la stimolazione è stata effettuata a livello del dorso e della mano e destra, per registrare le risposte corticali agli stimoli sono stati posizionati degli elettrodi ad ago nel sottocute, uno nella zona della fronte (Fz), uno nella zona sovrastante la proiezione della mano sull’*homunculus* corticale somatosensoriale controlateralmente al lato stimolato (C3’), uno a livello del lobo auricolare di sinistra (Au1) e uno al vertice (Cz).⁹⁰

Sono quindi stati creati due canali di registrazione, ognuno a due derivazioni (C3’-Fz e Cz-Au1, Figura 6).

Le risposte alla stimolazione continua (NEP) sono state registrate dal canale del cuoio capelluto C3’-Fz, mentre le risposte alla stimolazione *random* (PREP) sono state registrate sia dal canale

C3'-Fz che dal canale Cz-Au1; in ogni caso, i segnali sono stati amplificati 100.000 volte con filtro passa-banda 0.1-2000 Hz utilizzando il filtraggio analogico Butterworth di 2° ordine (amplificatori LT di Vertigo, Genova, Italia).

I segnali sono stati poi convertiti da analogici a digitali (NI PCIe-6320, X Series Multifunction DAQ, 16 Bit, 250 KS/s sampling rate da National Instruments, Austin, Texas). Sono stati acquisiti venticinquemila campioni per 1000 ms dopo ogni stimolo, utilizzando uno specifico software sviluppato con il linguaggio grafico LabVIEW® 2014 (National Instruments, Austin, Texas), fornendo così una registrazione ad alta definizione con un *dwell time* di 0,04 ms. Il tempo di acquisizione post-stimolo è stato di 500 ms, mentre la fase di *pre-trigger* è durata 300 ms. Durante l'analisi *offline*, le registrazioni con artefatti biologici o interferenze elettromagnetiche sono state scartate.

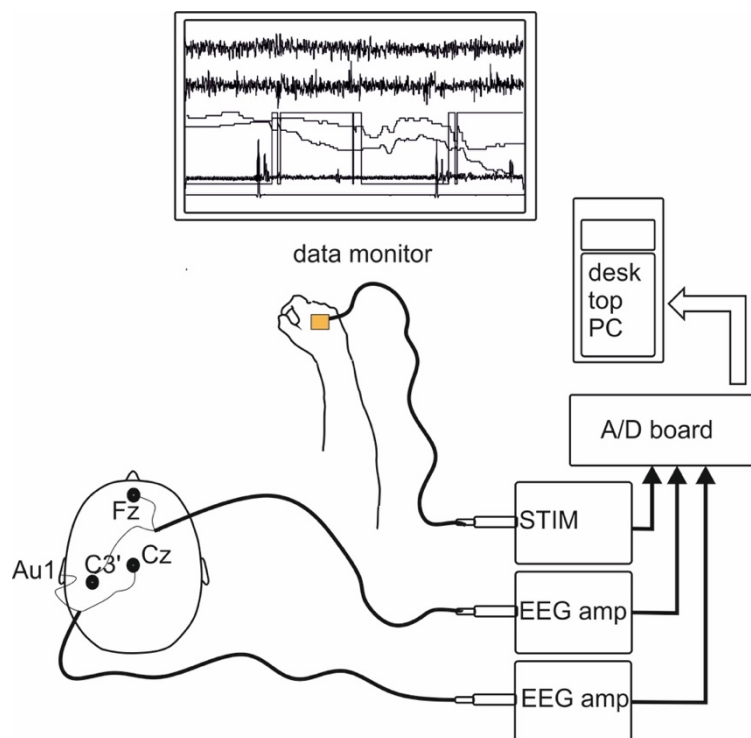


Figura 6 – Registrazione dei PREP e dei NEP.

3.3.2 VISUALIZZAZIONE DELLE TRACCE

PREP

Quando si stimola un individuo con l'elettrodo *micropatterned* 150 IDE, mandando un impulso randomico in un intervallo compreso tra 6 e 15 secondi, si ottiene, tramite la registrazione delle risposte corticali, un'onda che si può disporre in un grafico avente come ascissa la latenza e come ordinata l'ampiezza. Si vedrà quindi una sorta di EEG (elettroencefalogramma) a due canali (C3'-Fz e Cz-Au1) con deflessioni positive e negative, che nel sano tendono ad assumere un *pattern* tipico, nel quale le onde si presentano solitamente alla stessa latenza, anche in individui diversi.

Ad esempio, nel caso della stimolazione a intervalli *random*, osservando il canale C3'-Fz, la prima onda che si vede è una deflessione negativa (quindi verso l'alto) che prende il nome di N1, ad una latenza di circa 100 ms.

Osservando invece il canale Cz-Au1, si vedono solitamente una deflessione negativa (N2) e una positiva, quindi verso il basso (P2).

NEP

I NEP sono stati ottenuti dopo stimolazione del dorso della mano destra tra I e II metacarpo con sempre con l'elettrodo *micropatterned* 150 IDE, ma con una stimolazione ritmica, continua, che prevedeva un impulso al secondo.

Tramite le registrazioni del canale C3'-Fz, si registra così una traccia con delle deflessioni con un *pattern* piuttosto ripetitivo, che è stato preso come riferimento per assegnare, anche in questo caso, la corretta denominazione alle deflessioni apprezzabili.

Queste onde sono, come nel caso precedente, positive quando deflettono verso il basso (P) o negative, se deflettono verso l'alto (N). E' stato così possibile identificare diverse deflessioni, un esempio è rappresentato da P30 che rappresenta la prima deflessione verso il

basso, attesa ad una latenza di circa 30 ms. Nei NEP, quindi, il numero che segue la lettera N o la lettera P, rappresenta la latenza teorica in ms.

3.4 Misurazione della conduttanza elettrochimica cutanea

E' stato usato il dispositivo Sudoscan (Impeto Medical) che valuta le variazioni dell'ESC (Conduttanza Elettrochimica Cutanea) dovute al flusso di ioni cloruro nella pelle, in risposta a una corrente continua a bassa tensione applicata localmente (< 4 V). Per svolgere questa valutazione si è chiesto ai pazienti di posizionare mani e piedi su grandi elettrodi piatti di nichel. Durante la registrazione, anodo e catodo si invertono continuamente e l'anodo fornisce una corrente a bassa intensità che determina una differenza di potenziale (< 4 V) rispetto al catodo. Pertanto, una corrente a bassa tensione (< 4 V) passa attraverso gli elettrodi per 2 minuti. Questo genera una corrente elettrica la cui ampiezza è correlata alla concentrazione di ioni cloruro. L'ESC, espressa in microsiemens (μ S), viene determinata sulla base della corrente associata alla tensione applicata.

Questo strumento consente quindi di valutare la funzione sudomotoria, che dipende principalmente dalle fibre amieliniche C.



Figura 7 – Dispositivo Sudoscan (Impeto Medical).

3.5 Analisi dei dati

Trattandosi di uno studio esplorativo, non è stato eseguito alcun calcolo della dimensione del campione a priori. Le variabili continue sono state riportate come mediane e intervalli in caso di distribuzione non normale o come medie e deviazioni standard (SD) in caso di distribuzione assimilabile a una gaussiana, mentre le variabili categoriche sono state riportate come numeri assoluti e percentuali del totale dei pazienti. La normalità dei dati è stata esplorata con il test di Shapiro-Wilk. In particolare, nel caso $p > 0.05$, l'ipotesi nulla, che presuppone la normalità della distribuzione dei valori, è stata considerata vera. Per i confronti tra gruppi, inoltre, è stata verificata l'omoschedasticità utilizzando il test di Levene (in caso di $p > 0.05$, l'ipotesi nulla di omoschedasticità è stata considerata vera). I dati dei soggetti affetti e di controllo sono stati confrontati con il test t di Student o con il test U di Mann-Whitney, a

seconda della distribuzione rispettivamente normale o meno dei valori. La relazione tra 150IDE-NEP e parametri clinici o demografici, conduttanza elettrochimica cutanea, scale di valutazione e punteggi dei questionari è stata esplorata con l'analisi di correlazione (coefficiente di correlazione di Pearson r o coefficiente di correlazione ρ di Spearman, a seconda della distribuzione rispettivamente normale o meno dei valori). I risultati sono stati considerati statisticamente significativi in presenza di p -value $< 0,05$ a due code. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il *software open source* Jamovi.

4. Risultati

4.1 Caratteristiche demografiche e cliniche delle popolazioni studiate

4.1.1 PAZIENTI CANVAS

Il numero totale di pazienti CANVAS presi in considerazione per questo studio è stato di 12 individui, di cui 2 di sesso femminile e 10 di sesso maschile. L'età media di questo gruppo di pazienti è risultata essere 68 ± 6 (SD) anni. La durata media di malattia (tempo trascorso dall'esordio dei primi sintomi, escludendo la tosse stizzosa) dei pazienti studiati era di $12 \pm 6,25$ anni.

Su 12 pazienti, 5 (42%) presentano ipoestesia termica alle mani, 6 (50%) ipoestesia termica ai piedi; tutti i pazienti che presentano ipoestesia termica alle mani presentano anche ipoestesia termica ai piedi, mentre uno di loro presenta solo ipoestesia termica ai piedi. Per quanto riguarda il dolore neuropatico, questo è risultato presente in 9 pazienti su 12 (75%), e di questi pazienti 7 assumono farmaci per il dolore neuropatico (58% sul totale dei pazienti CANVAS, 78% sul totale dei pazienti CANVAS con dolore neuropatico).

Per quanto riguarda i sintomi disautonomici, 3 pazienti su 12 (25%) presentano stipsi e 3 pazienti su 12 (25%) presentano franca ipotensione ortostatica.

Un sintomo molto caratteristico, rilevato in 8 pazienti su 12 (67%), è quello della tosse secca stizzosa, che precede anche di diversi decenni l'esordio dei sintomi neurologici.

Inoltre, 6 pazienti su 12 (50%) presentano una compromissione della motilità oculare, esprimibile come scomposizione delle

saccadi, oscillopsia o nistagmo e 5 tra questi 6 pazienti (83% sul totale di coloro che presentano motilità oculare alterata, 42% sul totale dei pazienti CANVAS) presentano alterazione dei VVOR (Visual Vestibular Ocular Reflex).

All'esame neurologico è anche stato possibile obiettivare la presenza di disartria in 3 pazienti su 12 (25%) e di disfagia in 3 pazienti su 12 (25%), solo in un caso le due coesistono nello stesso individuo.

Un paziente (8%) presenta inoltre sintomi cognitivo-comportamentali.

Tra tutti i pazienti CANVAS, 4 su 12 (33%) necessitano di concreto aiuto alla deambulazione: 2 (16%) necessitano di singolo appoggio, 1 (8%) necessita di doppio appoggio con deambulatore e 1 (8%) necessita di sedia a rotelle.

Per quanto riguarda la dismetria, 3 di loro (25%) presentano dismetria alle prove indice-naso e calcagno-ginocchio.

Infine, 2 pazienti (16%) presentano piede cavo bilateralmente.

Caratteristica	Percentuale sul totale
Ipoestesia termica mani	42%
Ipoestesia termica piedi	50%
Dolore neuropatico	75%
Necessità farmaci dolore neuropatico	58% (78% considerando solo chi soffre di dolore neuropatico)
Stipsi	25%
Ipotensione ortostatica	25%
Tosse secca stizzosa	67%
Compromissione motilità oculare	50%

VVOR alterati	42% (83% considerando solo chi presenta compromissione della motilità oculare)
Disartria	25%
Disfagia	25%
Sintomi cognitivo-comportamentali	8%
Ausilio alla deambulazione	33%
Dismetria	25%
Piede cavo bilateralmente	16%

Tabella 7 – Frequenza di presentazione di sintomi e caratteristiche cliniche nella popolazione CANVAS studiata.

Alla scala CMTES, i pazienti CANVAS hanno un punteggio medio di $12 \pm 3,7$, alla scala SARA di $10,8 \pm 7,8$.

4.1.2 GRUPPI DI CONTROLLO

Controlli sani

Sono stati considerati 20 controlli sani, di cui 13 di sesso femminile e 7 di sesso maschile. L'età media dei controlli sani è di 34,7 anni $\pm 14,8$.

Di tutti i controlli sani, nessuno ha ottenuto risultati alterati al Sudoscan e tutti presentano esame obiettivo neurologico privo di alcuna alterazione.

Pazienti ATTRv

Lo studio ha incluso 12 pazienti con diagnosi genetica di ATTRv di cui 8 (67%) sintomatici e 4 (33%) presintomatici.

Tra gli 8 pazienti sintomatici, 2 sono di sesso femminile e 6 di sesso maschile, i 4 pazienti presintomatici sono invece tutti di sesso femminile.

L'età media dei pazienti ATTRv sintomatici è di 76 anni \pm 6,6, mentre l'età media dei pazienti ATTRv presintomatici è di 44,7 anni \pm 9,77.

Tra i pazienti sintomatici la durata media di malattia è di 6,13 anni \pm 2,23.

Dal momento che tutti i portatori presintomatici presentano la variante TTR Phe64Leu, e la PADO è di 69 anni per questa mutazione, il Time to PADO nella popolazione ATTRv presintomatica ha un valore medio di 23,5 \pm 10,24.

Tra i pazienti risultati positivi al test genetico per ATTRv, quindi sia sintomatici che presintomatici, abbiamo osservato diverse mutazioni responsabili di malattia:

- *Phe64Leu* \rightarrow presente in 7 pazienti su 12 (58%), di cui 3 sintomatici e 4 asintomatici
- *Val30Met* \rightarrow presente in 1 paziente su 12 (8%)
- *Ala120Thr* \rightarrow presente in 1 paziente su 12 (8%)
- *Tyr98Phe* \rightarrow presente in 1 paziente su 12 (8%)
- *Val122Ile* \rightarrow presente in 1 paziente su 12 (8%)
- *Ile88Leu* \rightarrow presente in 1 paziente su 12 (8%)

Mutazione	Percentuale sul totale
Phe64Leu	58%
Val30Met	8%
Ala120Thr	8%
Tyr98Phe	8%
Val122Ile	8%
Ile88Leu	8%

Tabella 8 – Frequenza delle diverse mutazioni genetiche nei pazienti ATTRv studiati.

Il 100% (n. 7) dei pazienti ATTRv sintomatici hanno un risultato alterato allo studio con il Sudoscan, invece il 100% (n. 4) dei pazienti ATTRv presintomatici è risultato privo di alterazioni della sudorazione cutanea all'esame con il Sudoscan.

Per quanto riguarda l'ipoestesia termica delle mani nei pazienti ATTRv sintomatici, 2 pazienti su 7 risultano soffrirne (28%), risulta invece che 3 pazienti su 7 (43%) soffrano di ipoestesia termica ai piedi; mentre tutti i pazienti presintomatici, in quanto tali, non presentano né ipoestesia termica né alcun altro sintomo.

Il dolore neuropatico è presente in 3 pazienti su 7 (43%), e 2 di questi pazienti assumono farmaci per il dolore neuropatico (28%).

La somministrazione di scale di valutazione ai pazienti ATTRv sintomatici ha fornito i seguenti risultati:

- *CADT %* → punteggio medio $74 \pm 15,3$
- *COMPASS-31* → punteggio medio $20,5 \pm 10,8$
- *Karnofsky Performance Status* → punteggio medio $83,75 \pm 15,98$
- *PND Score* → 1 pz con punteggio 0, 4 pazienti con punteggio 1, 1 paziente con punteggio 2, 1 paziente con punteggio 3a, 1 paziente con punteggio 3b

- *NIS Score* → punteggio medio 28,12 ± 23,26
- *NIS-LL (Lower Limb) Score* → punteggio medio 15,5 ± 14,26
- *Norfolk Quality of Life – Diabetic Neuropathy (QOL-DN)* → punteggio medio 38 ± 30,9
- *SF-36 Physical Functioning* → punteggio medio 40 ± 35,8
- *SF-36 Role Limitations Physical Health* → punteggio medio 40,62% ± 46,2
- *SF-36 Role Limitations Emotional Problems* → punteggio medio 87,5% ± 35,35
- *SF-36 Energy/Fatigue* → punteggio medio 45% ± 22,8
- *SF-36 Emotional* → punteggio medio 62,5% ± 20,38
- *SF-36 Social Functioning* → punteggio medio 70,31% ± 29,83
- *SF-36 Pain* → punteggio medio 69,37% ± 32,83
- *SF-36 General Health* → punteggio medio 36,87% ± 16,24
- *SF-36 Health Change* → punteggio medio 34,37% ± 22,90

4.2 Risultati al Sudoscan dei pazienti CANVAS

All'esame con il Sudoscan, 7 pazienti su 12 (58%) hanno un risultato alterato, ossia presentano una alterazione nella sudorazione cutanea, e quindi nella ESC.

Di questi 7 soggetti, il 100% presentava alterazione della conduttanza elettrochimica cutanea nella mano destra, ossia la nostra sede di stimolazione con l'elettrodo 150 IDE.

4.3 Questionari per i sintomi disautonomici nella CANVAS

4.3.1 CADT%

Punteggi ottenuti alla scala CADT nei pazienti con malattia correlata a espansione biallelica intronica di *RFC1*:

Pazienti CANVAS	Punteggio CADT%
G.T.	85
A.F.	70
A.M.	80
F.T.	100
L.M.	85
F.O.	68,75
M.S.	50
P.P.	45
G.P.	45
S.V.	65
G.C.	70
C.B.	70

Tabella 9 – Punteggi % al CADT nei pazienti CANVAS.

Il punteggio medio percentuale alla scala CADT è di 69,5% \pm 16,8.

4.3.2 COMPASS-31

Punteggi ottenuti alla scala COMPASS-31 nei pazienti affetti da malattia correlata ad espansione biallelica intronica di *RFC1*:

Paziente CANVAS	Punteggio COMPASS-31 (0-100)
G.T.	7
A.F.	24
A.M.	8
F.T.	14
L.M.	7
F.O.	15
M.S.	31
P.P.	36
G.P.	46
S.V.	30
G.C.	24
C.B.	24

Tabella 10 – Punteggi al COMPASS-31 nei pazienti CANVAS.

Il punteggio medio alla scala COMPASS-31 è di $23 \pm 12,8$.

4.4 Potenziali Evocati Dolore-Correlati (PREP) dopo stimolazione random con elettrodo 150 IDE

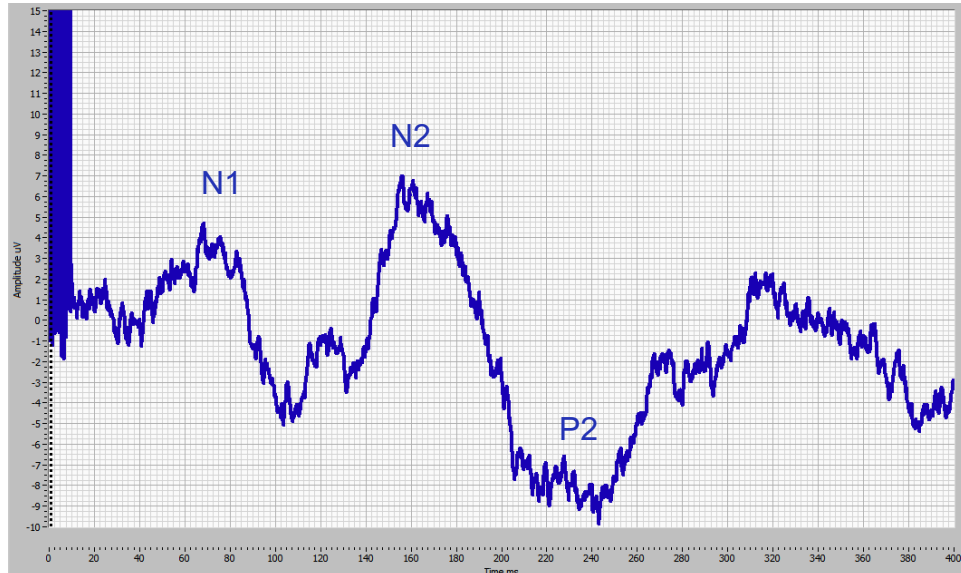


Figura 8 – Traccia normale dei PREP.

4.4.1 LATENZA MEDIA DI N1, N2 E P2 NEI CANVAS E NEI CONTROLLI

Valutando in tutti i pazienti le latenze di risposta (in ms) nelle registrazioni corticali, dopo stimolazione a intervalli *random* con l'elettrodo *multipatterned* 150 IDE, abbiamo ottenuto i risultati riportati in Tabella 11.

Onda	Media CANVAS	Media ATTRv sintomatici	Media controlli sani
N1 (C3'-Fz)	130,40 ± 15,52 ms	103,9 ± 22,59 ms	120 ± 23,12 ms
N2 (Cz-Au1)	207,74 ± 21,6 ms	190,5 ± 59,46 ms	181 ± 40,96 ms

P2 (Cz-Au1)	287,80 ± 63,95 ms	270,86 ± 73,57 ms	245,87 ± 35,15 ms
--------------------	----------------------	----------------------	----------------------

Tabella 11 – Valori medi di latenza delle deflessioni registrate ai PREP nei pazienti CANVAS e nei controlli.

I test T di Student per campioni indipendenti/U di Mann-Whitney non hanno evidenziato differenze significative nella latenza delle risposte N1, N2, P2 tra pazienti CANVAS e controlli sani.

Hanno però evidenziato una differenza significativa nella latenza di N1 tra CANVAS e ATTRv sintomatici, in particolare la latenza risulta aumentata nelle CANVAS più di quanto non lo sia nelle amiloidosi sintomatiche (p = 0,02).

4.4.2 AMPIEZZA MEDIA DI N1, N2 E P2 NEI CANVAS E NEI CONTROLLI

Valutando in tutti i pazienti le ampiezze delle risposte (in ms) nelle registrazioni corticali ottenute dopo stimolazione *random* con l'elettrodo *micropatterned* 150 IDE, abbiamo ottenuto i risultati mostrati in Tabella 12.

Onda	Media CANVAS	Media ATTRv symptomatic	Media controlli sani
N1 (C3'-Fz)	4,23 ± 6,12 µV	2,72 ± 2,657 µV	10,21 ± 6,94 µV
N2 (Cz-Au1)	3,08 ± 3,96 µV	3,52 ± 4 µV	7,83 ± 7,53 µV
P2 (Cz-Au1)	4,82 ± 5,48 µV	5,8 ± 3,96 µV	6,41 ± 2,59 µV

Tabella 12 – Valori medi di ampiezza delle deflessioni registrate ai PREP nei pazienti CANVAS e nei controlli.

I pazienti con CANVAS avevano un'ampiezza significativamente inferiore delle componenti N1 ($p = 0,004$, Grafico 1), N2 ($p = 0,016$, Grafico 2) e P2 ($p = 0,002$, Grafico 3) rispetto ai sani.

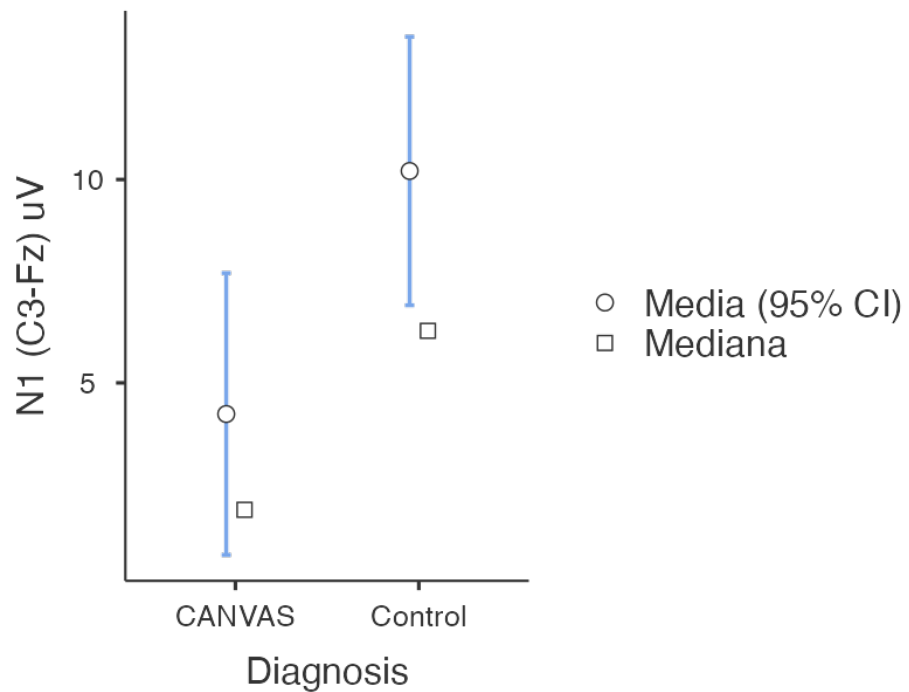


Grafico 1 – Confronto tra ampiezza di N1 ai PREP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Mann-Whitney U test, $p = 0,004$.

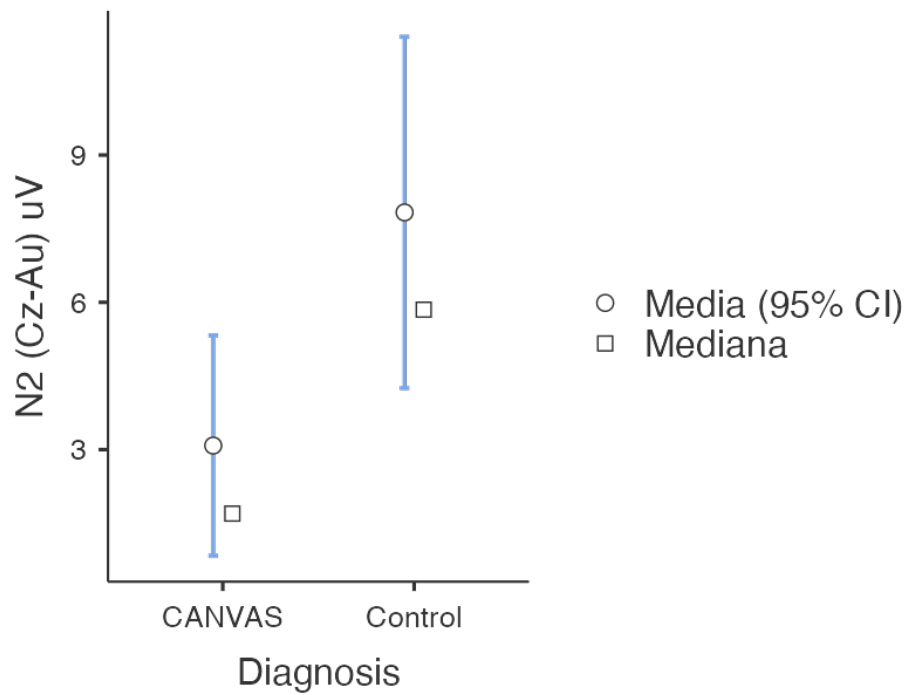


Grafico 2 - Confronto tra ampiezza di N2 ai PREP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Mann-Whitney U test, $p = 0,016$

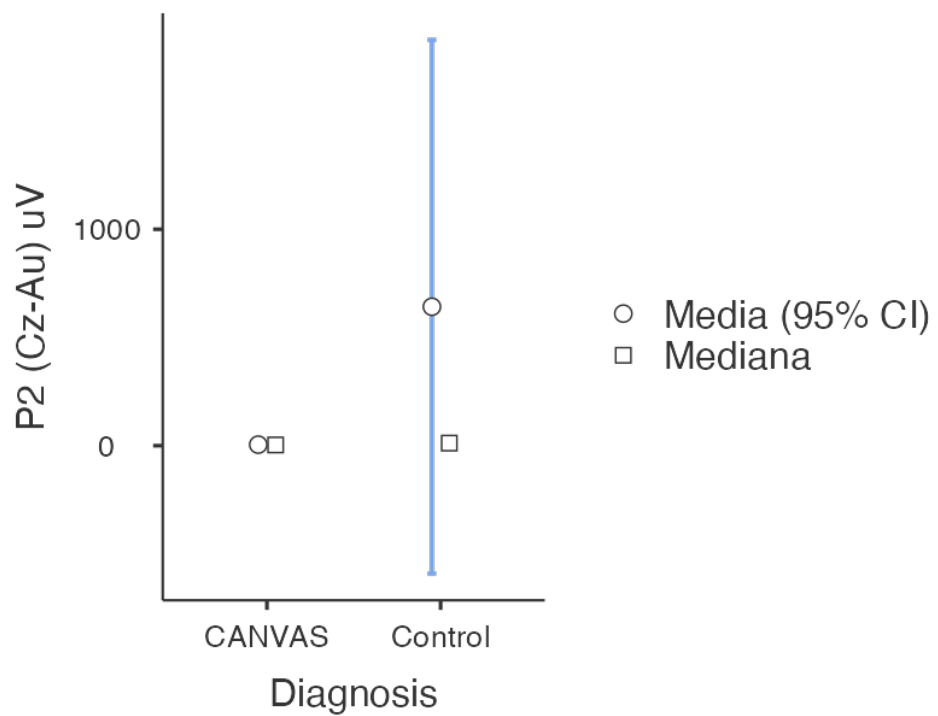


Grafico 3 - Confronto tra ampiezza di N2 ai PREP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Mann-Whitney U test, $p = 0,002$.

Nel confronto tra ampiezze di N1, N2 e P2 tra pazienti CANVAS e amiloidosi sintomatici, non si è evidenziata alcuna differenza significativa. Però il confronto tra gruppi con ANOVA non parametrica a una via e successivo confronto a coppie di Dwass-Steel-Critchlow-Fligner ha dimostrato una minor ampiezza della componente N2 ($p= 0,039$) rispetto ai sani solo nei pz CANVAS. Sia pazienti con CANVAS che con amiloidosi avevano invece una ampiezza inferiore delle componenti N1 ($p = 0,011$ e $p = 0,013$ rispettivamente) e P2 ($p = 0,005$ e $p = 0,045$ rispettivamente) rispetto ai sani.

Kruskal-Wallis

	χ^2	gdl	p	ϵ^2
N1 (C3-Fz) uV	12.073	2	0.002	0.345
N2 (Cz-Au) uV	7.306	2	0.026	0.209
P2 (Cz-Au) uV	11.845	2	0.003	0.338
N1 (C3-Fz) ms	5.725	2	0.057	0.191
N2 (Cz-Au) ms	3.239	2	0.198	0.112
P2 (Cz-Au) ms	1.500	2	0.472	0.052
Area2_RANDOM	7.581	2	0.023	0.223

Confronti a coppie - N1 (C3-Fz) uV

		W	p
ATTRv	CANVAS	- 0.362	0.965
ATTRv	Control	3.997	0.013
CANVAS	Control	4.075	0.011

Confronti a coppie - N2 (Cz-Au) uV

		W	p
ATTRv	CANVAS	-0.668	0.884
ATTRv	Control	2.650	0.146
CANVAS	Control	3.453	0.039

Confronti a coppie - P2 (Cz-Au) uV

		W	p
ATTRv	CANVAS	-0.911	0.796
ATTRv	Control	3.368	0.045
CANVAS	Control	4.394	0.005

Tabella 13 – Ampiezze dei PREP analizzate con ANOVA non parametrica e confronti a coppie di Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Rappresentazione dei PREP nella CANVAS

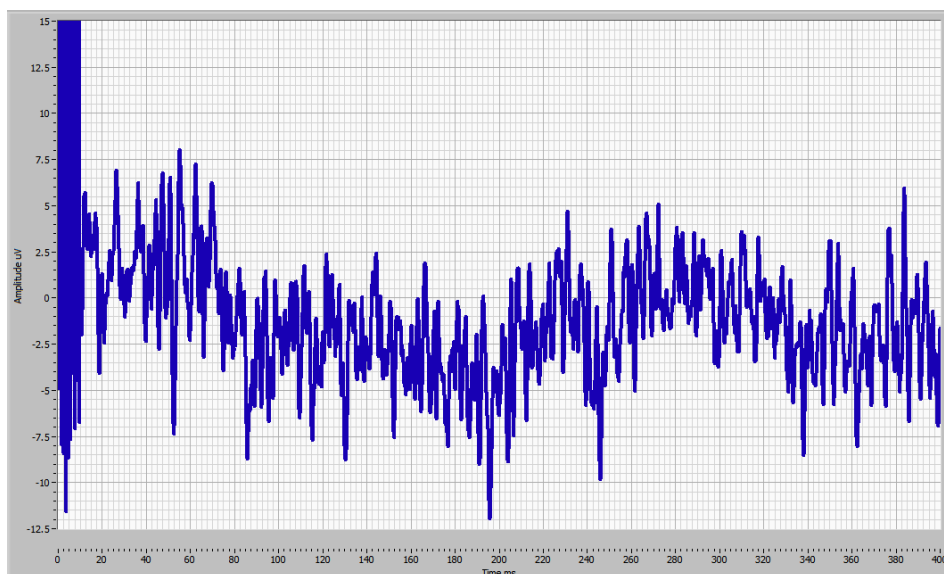


Figura 9 – Traccia dei PREP di un paziente CANVAS.

4.5 Potenziali Evocati Nocicettivi (NEP) dopo stimolazione ritmica con elettrodo 150 IDE

In Figura 9 è riportato un esempio di tracciato registrato in un soggetto sano, dove si evidenziano in particolare le risposte precoci P30, N40, P50, N60, P80.

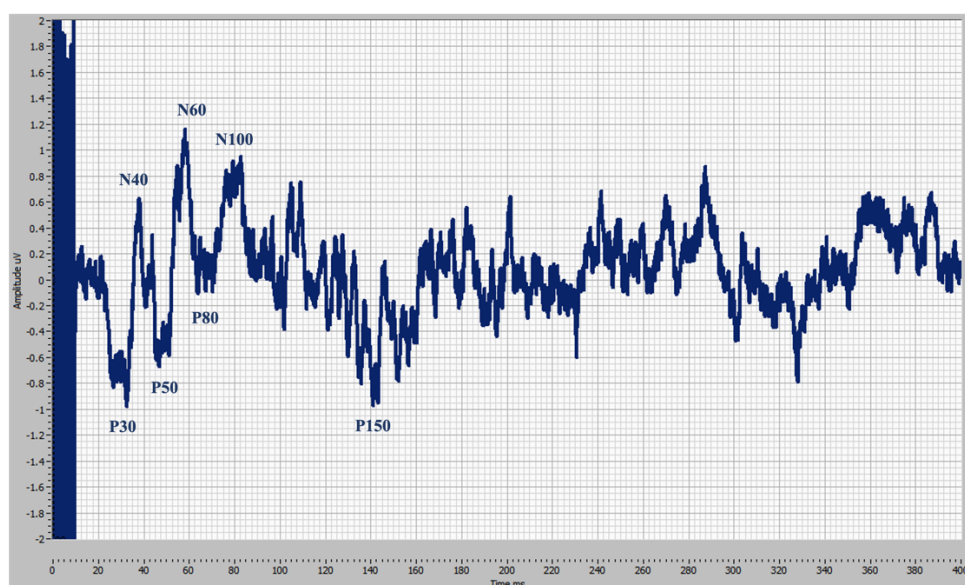


Figura 10 – Esempio di un tracciato normale ai NEP.

4.5.1 LATENZA MEDIA DELLE ONDE DA P30 A P150 NEI PAZIENTI CANVAS E NEI CONTROLLI

Analizzando le tracce registrate nei controlli sani, nei pazienti CANVAS e nei pazienti amiloidosi ATTRv abbiamo ottenuto i risultati relativi alle latenze, espresse in ms, riportati in Tabella 14.

Onda	Media CANVAS	Media ATTRv symptomatic	Media controlli sani
P30	39,27 ± 5,23 ms	35,5 ± 8,22 ms	33,26 ± 2,72 ms

N40	47,06 ± 2,55 ms	41,80 ± 8,95 ms	41,83 ± 2,49 ms
P50	63,68 ± 3,14 ms	55,91 ± 14,26 ms	52,07 ± 5,33 ms
N60	76,27 ± 14,7 ms	58,6 ± 6,58 ms	61,92 ± 8,22 ms
P80	102,2 ± 18,95 ms	77,05 ± 11,46 ms	78,29 ± 11,86 ms
N100	113,8 ± 22,8 ms	103,26 ± 19,51 ms	109,18 ± 23,1 ms
P150	151 ± 28,27 ms	156,28 ± 32,06 ms	163,6 ± 25,24 ms

Tabella 14 - Valori medi di latenza delle deflessioni registrate ai NEP nei pazienti CANVAS e nei controlli.

I pazienti con CANVAS avevano una latenza significativamente aumentata delle componenti P30 ($p < 0,001$, Grafico 4), N40 ($p < 0,001$, Grafico 5) e P50 ($p < 0,001$, Grafico 6) rispetto ai soggetti sani.

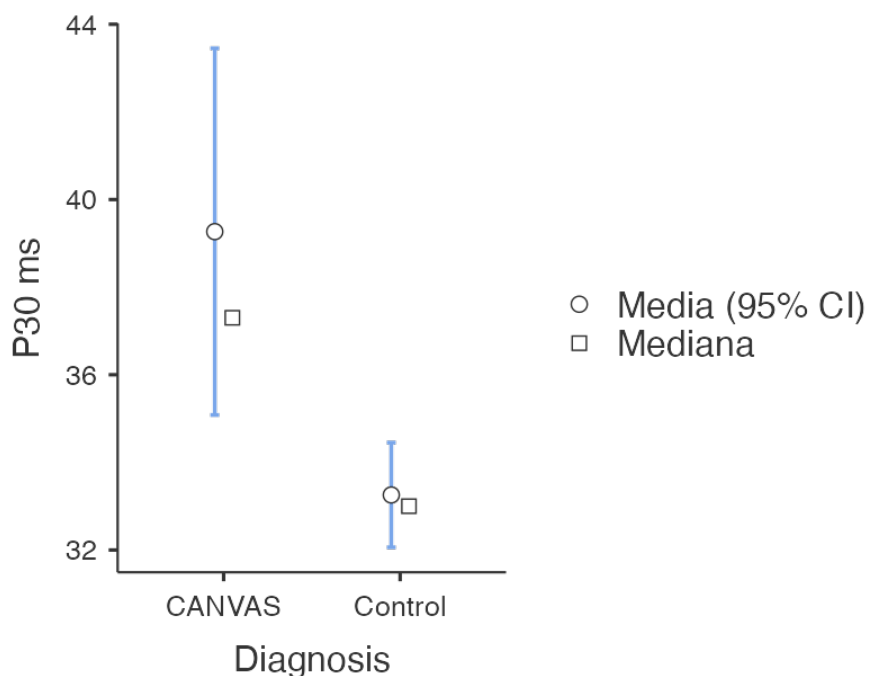


Grafico 4 - Confronto tra latenza di P30 ai NEP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Test t di Student, $p < 0,001$.

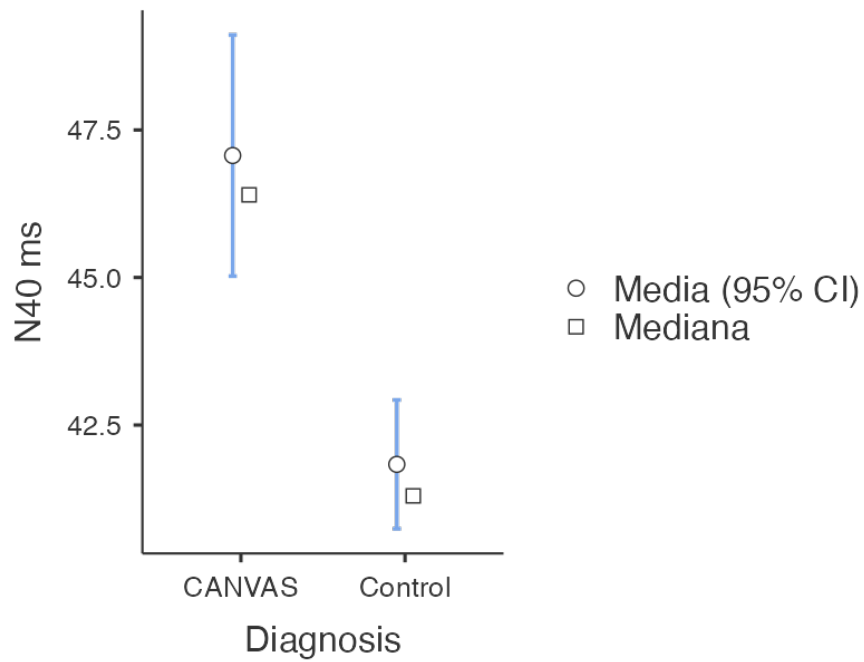


Grafico 5 - Confronto tra latenza di N40 ai NEP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Test t di Student, $p < 0,001$.

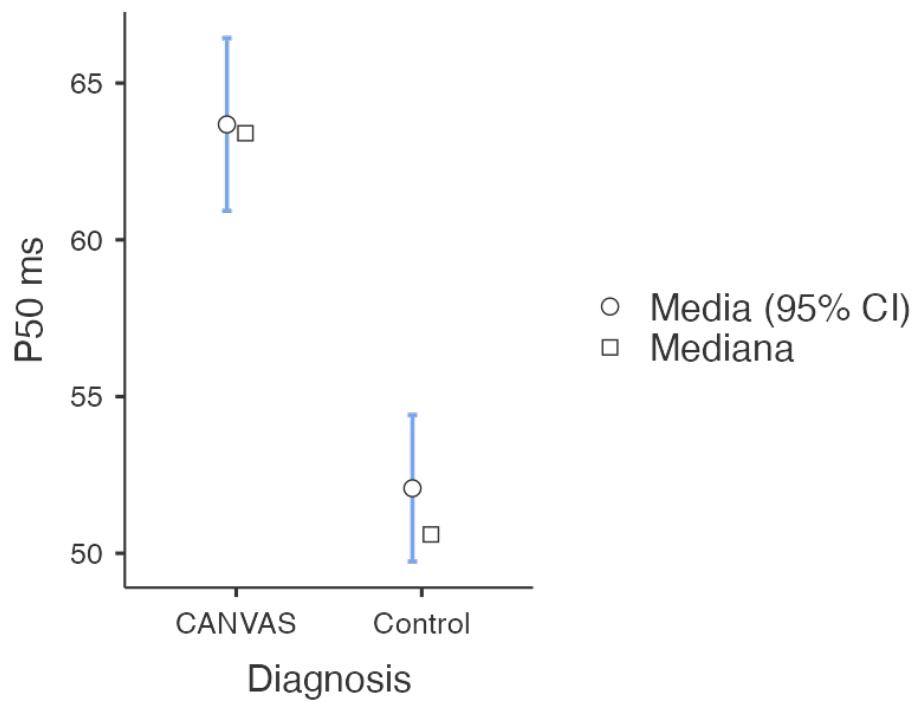


Grafico 6 - Confronto tra latenza di P50 ai NEP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Test t di Student, $p < 0,001$.

Nel confronto tra latenze ai NEP dei pazienti CANVAS e dei pazienti sintomatici con amiloidosi ereditaria da transtiretina, si sono evidenziate delle differenze, ma non significative. Si è solo potuto osservare che la media della latenza delle componenti precoci (P30, N40, P50, N60, P80) tendeva ad essere sempre più alta nei pazienti CANVAS che nei pazienti ATTRv, ma senza mai raggiungere un valore di p significativo.

4.5.2 AMPIEZZA MEDIA DELLE ONDE DA P30 A P150 NEI PAZIENTI CANVAS E NEI CONTROLLI

Analizzando le tracce registrate nei controlli sani, nei pazienti CANVAS e nei pazienti amiloidosi ATTRv abbiamo ottenuto i risultati relativi alle ampiezze, espresse in μV , riportati in Tabella 15.

Onda	Media CANVAS	Media ATTRv symptomatic	Media controlli sani
P30	0,28 \pm 0,37 μV	0,42 \pm 0,66 μV	1,06 \pm 1,27 μV
N40	0,4 \pm 0,54 μV	0,36 \pm 0,68 μV	0,9 \pm 0,68 μV
P50	1,21 \pm 1,87 μV	1,33 \pm 1,51 μV	1,01 \pm 0,96 μV
N60	0,32 \pm 0,59 μV	0,49 \pm 0,94 μV	0,81 \pm 0,93 μV
P80	0,17 \pm 0,41 μV	1,21 \pm 1,37 μV	0,8 \pm 0,69 μV
N100	0,75 \pm 1,05 μV	1,13 \pm 1,13 μV	2,38 \pm 2,07 μV
P150	0,27 \pm 0,60 μV	1,61 \pm 1,21 μV	1,12 \pm 1,19 μV

Tabella 15 - Valori medi di ampiezza delle deflessioni registrate ai NEP nei pazienti CANVAS e nei controlli.

I pazienti con CANVAS avevano un'ampiezza significativamente inferiore delle risposte P30 ($p = 0,013$, Grafico 7), N40 ($p = 0,018$,

Grafico 8), N60 ($p = 0,013$, Grafico 9), P80 ($p < 0,001$, Grafico 10), N100 ($p = 0,006$, Grafico 11) e P150 ($p = 0,002$, Grafico 12) rispetto ai soggetti sani.

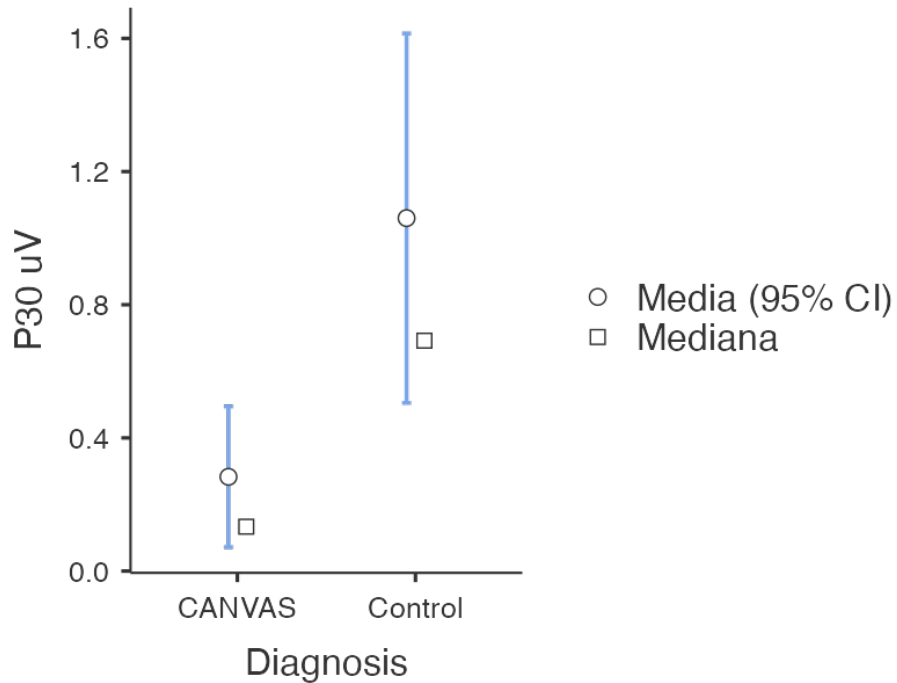


Grafico 7 - Confronto tra ampiezza di P30 ai NEP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Mann-Whitney U test, $p = 0,013$.

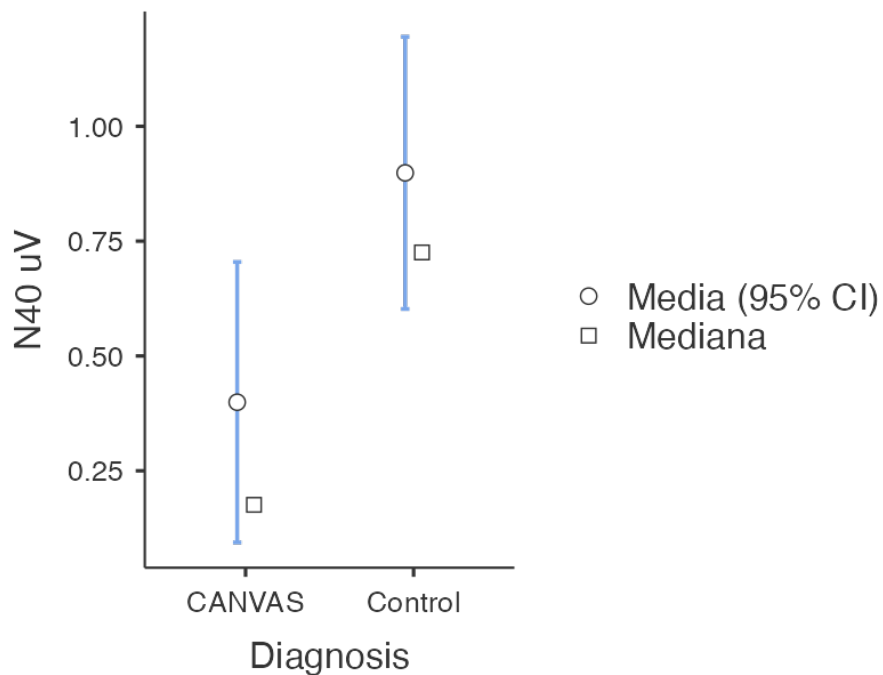


Grafico 8 – Confronto tra ampiezza di N40 ai NEP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Mann-Whitney U test, $p = 0,018$.

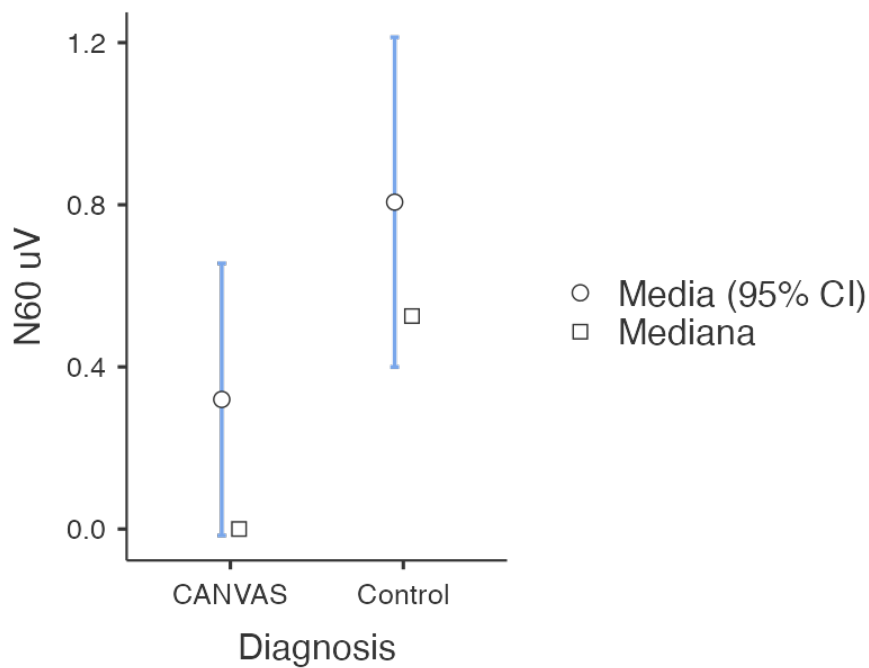


Grafico 9 – Confronto tra ampiezza di N60 ai NEP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Mann-Whitney U test, $p = 0,013$.

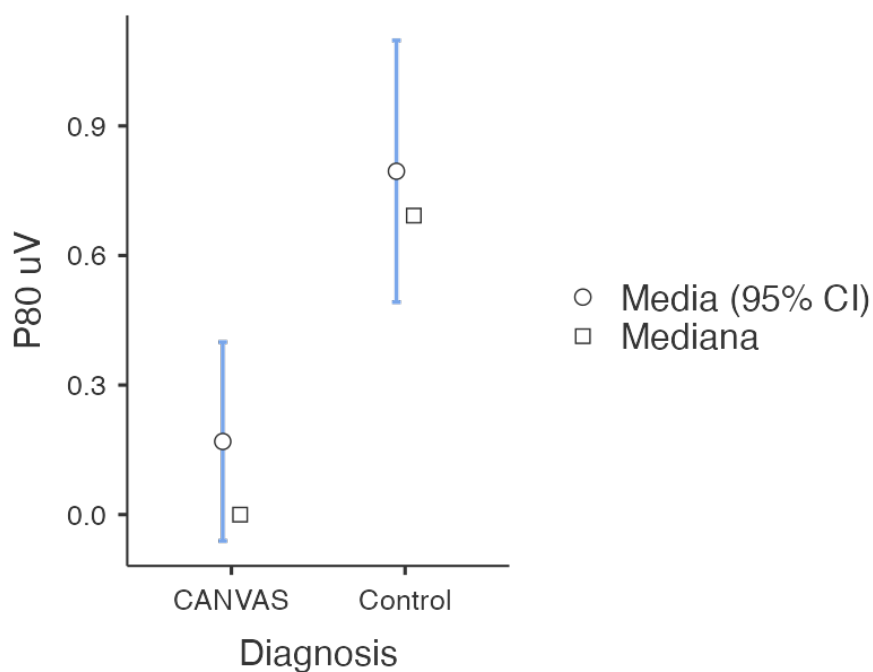


Grafico 10 - Confronto tra ampiezza di P80 ai NEP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Mann-Whitney U test, $p < 0,001$.

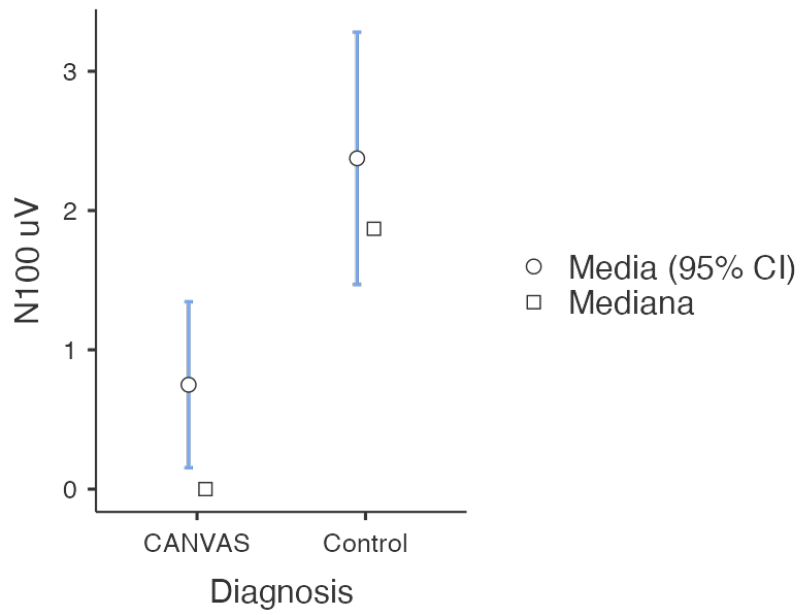


Grafico 11 - Confronto tra ampiezza di N100 ai NEP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Mann-Whitney U test, $p = 0,006$.

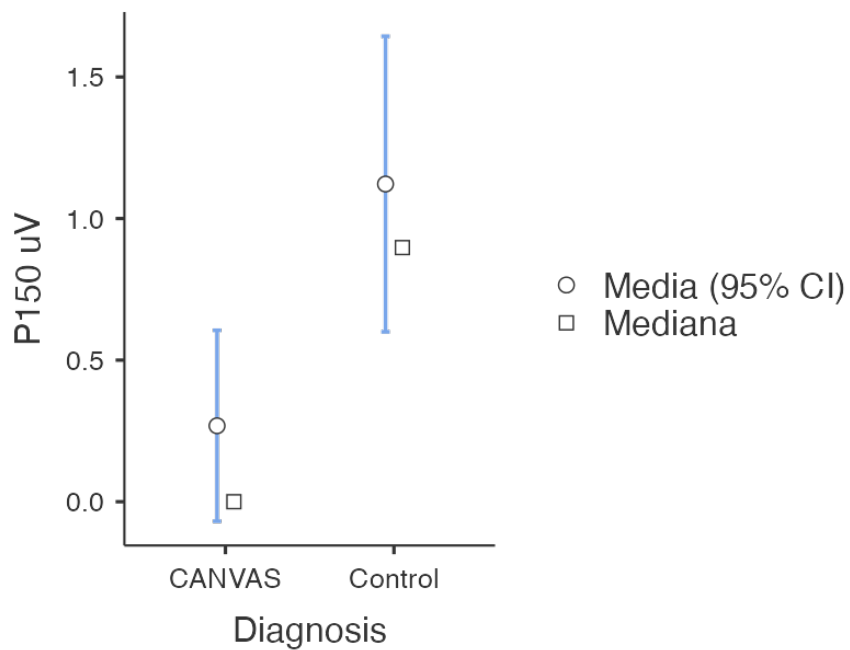


Grafico 12 - Confronto tra ampiezza di P150 ai NEP nei CANVAS e nei controlli sani (*Control*). Mann-Whitney U test, $p = 0,002$.

Al confronto tra ampiezze dei NEP nei pazienti CANVAS e ATTRv sintomatici, l'unica onda che è risultata ad ampiezza significativamente ridotta nei CANVAS rispetto alle amiloidosi è la P150 ($p = 0,005$).

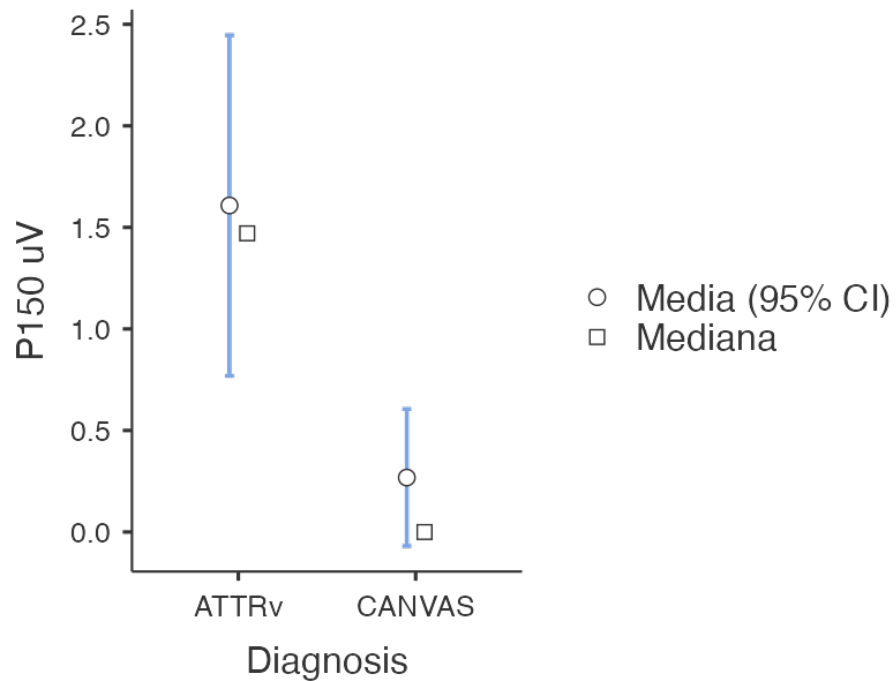


Grafico 13 - Confronto tra ampiezza di P150 ai NEP nei CANVAS e nei pazienti ATTRv. Mann-Whitney U test, $p = 0,005$.

Lo studio delle differenze tra gruppi con ANOVA non parametrica ad una via e con il successivo confronto a coppie di Dwass-Steel-Critchlow-Fligner ha evidenziato una latenza significativamente maggiore delle componenti P30 ($p = 0,007$), N40 ($p = 0,004$) e P50 ($p = 0,003$) nei pazienti CANVAS rispetto ai controlli (Tabella 16 e Tabella 17). Non sono invece emerse differenze significative tra ATTRv e controlli sani e ATTRv e CANVAS.

Kruskal-Wallis

	χ^2	gdl	p	ϵ^2
P30 ms	8.778	2	0.012	0.303
N40 ms	9.435	2	0.009	0.325
P50 ms	8.846	2	0.012	0.305
N60 ms	3.154	2	0.207	0.137
P80 ms	3.155	2	0.206	0.137
N100 ms	0.584	2	0.747	0.019
P150 ms	0.927	2	0.629	0.034

Tabella 16 – ANOVA a una via non parametrica con confronto delle latenze dei NEP tra sani, pazienti con ATTRv e CANVAS.

Confronti a coppie - P30 ms

		W	p
ATTRv	CANVAS	1.210	0.669
ATTRv	Control	-1.151	0.695
CANVAS	Control	-4.306	0.007

Confronti a coppie - N40 ms

		W	p
ATTRv	CANVAS	1.809	0.407
ATTRv	Control	0.877	0.809
CANVAS	Control	-4.564	0.004

Confronti a coppie - P50 ms

		W	p
ATTRv	CANVAS	1.333	0.614
ATTRv	Control	-0.337	0.969
CANVAS	Control	-4.617	0.003

Tabella 17 – Confronto a coppie di Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

I pazienti CANVAS avevano latenza significativamente maggiore delle componenti P30, N40, P50 rispetto ai controlli.

Per quanto riguarda l'ampiezza dei NEP, i pazienti CANVAS avevano un'ampiezza significativamente inferiore delle componenti P30 ($p = 0,03$), N40 ($p = 0,028$), P80 ($p = 0,009$), N100 ($p = 0,007$). E P150 ($p=0,004$) rispetto ai controlli.

Kruskal-Wallis

	χ^2	gdl	p	ϵ^2
P30 μV	8.233	2	0.016	0.211
N40 μV	9.092	2	0.011	0.233
P50 μV	1.440	2	0.487	0.037
N60 μV	7.629	2	0.022	0.196
P80 μV	10.599	2	0.005	0.272
N100 μV	8.957	2	0.011	0.230
P150 μV	12.208	2	0.002	0.313
Area1V*ms	1.072	2	0.585	0.027
Area2V*ms	4.095	2	0.129	0.105

Tabella 18 - ANOVA a una via non parametrica con confronto delle ampiezze dei NEP tra sani, pazienti con ATTRv e CANVAS.

Confronti a coppie - P30 uV

		W	p
ATTRv	CANVAS	-0.466	0.942
ATTRv	Control	2.953	0.092
CANVAS	Control	3.534	0.033

Confronti a coppie - N40 uV

		W	p
ATTRv	CANVAS	0.350	0.967
ATTRv	Control	3.529	0.034
CANVAS	Control	3.369	0.045

Confronti a coppie - N60 uV

		W	p
ATTRv	CANVAS	-0.605	0.904
ATTRv	Control	2.537	0.172
CANVAS	Control	3.540	0.033

Confronti a coppie - P80 uV

		W	p
ATTRv	CANVAS	-2.690	0.138
ATTRv	Control	0.000	1.000
CANVAS	Control	4.863	0.002

Confronti a coppie - N100 uV

		W	p
ATTRv	CANVAS	-1.487	0.545
ATTRv	Control	2.518	0.176
CANVAS	Control	3.929	0.015

Confronti a coppie - P150 uV

		W	p
ATTRv	CANVAS	-4.022	0.012
ATTRv	Control	-1.871	0.383
CANVAS	Control	4.327	0.006

Tabella 19 - Confronto a coppie di Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Rappresentazione dei NEP nella CANVAS

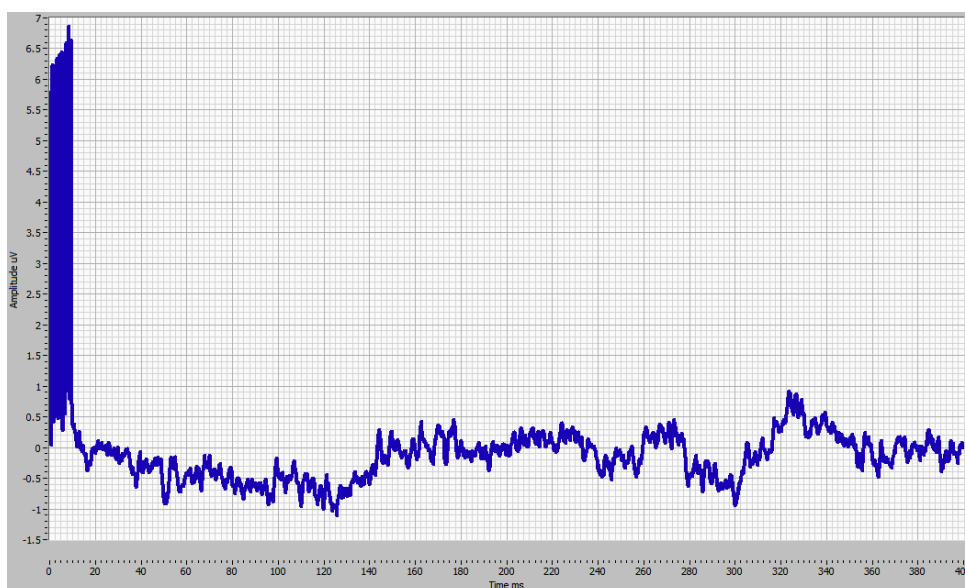


Figura 11 – Traccia dei NEP di un paziente CANVAS.

Rappresentazione dei NEP nelle amiloidosi da transtiretina sintomatiche

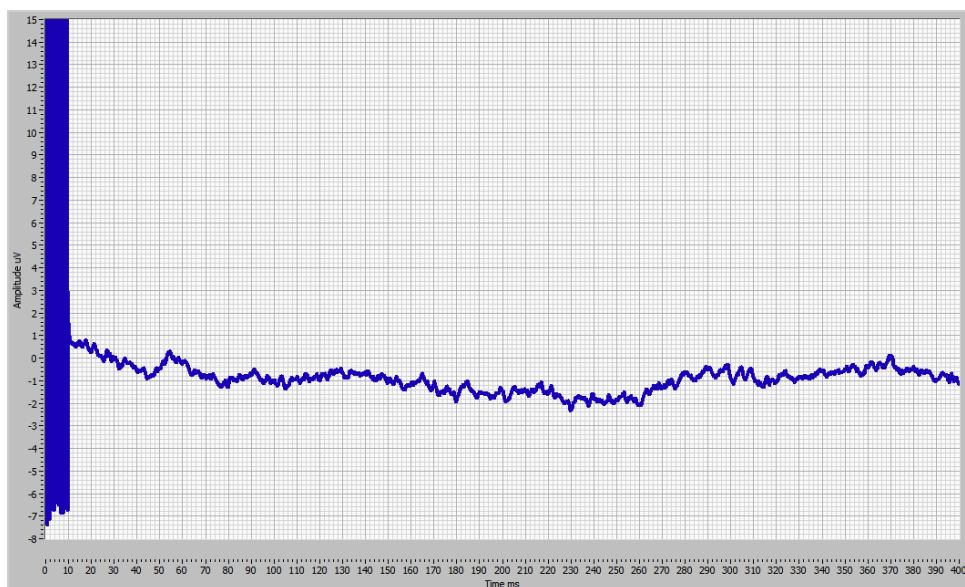


Figura 12 – Traccia dei NEP di un paziente ATTRv sintomatico.

4.6 Differenza d'età tra le due popolazioni: CANVAS e controlli sani

La differenza di età tra pazienti con CANVAS e soggetti sani risulta significativa al test a campioni indipendenti U di Mann-Whitney, con un valore di $p < 0.001$ (Grafico 14).

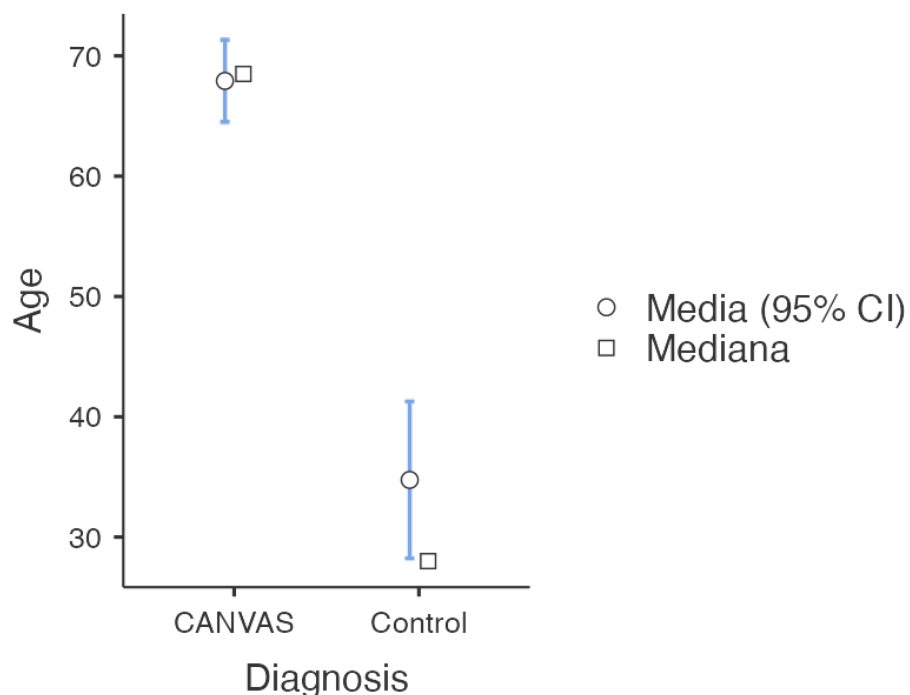


Grafico 14 - Rappresentazione della differenza di età media tra due gruppi presi in considerazione: pazienti affetti da CANVAS e pazienti sani (*Control*). Test U di Mann-Whitney, $p < 0.001$.

Per ovviare a questo *bias* dovuto alla differenza d'età nei due gruppi, abbiamo svolto un'analisi di correlazione nei soggetti sani, che verificasse l'assenza di correlazione dell'ampiezza delle varie onde dei NEP con l'età. Nessuna ampiezza risulta significativamente correlata all'età nei sani (Tabella 20).

		Age
Age	Spearman's rho	—
	Df	—
	p-value	—
P30 uV	Spearman's rho	-
	Df	18
	p-value	0.385
N40 uV	Spearman's rho	0.120
	Df	18
	p-value	0.613
P50 uV	Spearman's rho	-
	Df	18
	p-value	0.283
N60 uV	Spearman's rho	0.091
	Df	18
	p-value	0.702
P80 uV	Spearman's rho	-
	Df	18
	p-value	0.340
N100 uV	Spearman's rho	-
	Df	18
	p-value	0.310
	Df	18
	p-value	0.183

		Age
P150	Spearman's	0.177
uV	rho	
	Df	18
	p-value	0.456

Tabella 20 – Analisi di correlazione tra età e ampiezza delle varie componenti dei NEP nel gruppo di controllo. Nessun risultato significativo.

4.7 NEP come parametro di gravità di malattia tra gli individui affetti da CANVAS

In Tabella 21 sono riportati i valori di deviazione standard, media, media + 1 SD, media + 2 SD e media + 3 SD per la latenza di ogni onda dei NEP nel gruppo dei pazienti sani.

Onda	1 SD	2 SD	3 SD	Media + 2 SD	Media + 3 SD
P30 ms	2,79	5,58	8,37	38,74	41,53
N40 ms	2,45	4,9	7,35	46,51	48,96
P50 ms	5,4	10,8	16,2	62,35	67,75
N60 ms	6,23	12,46	18,69	72,08	78,31
P80 ms	8,35	16,7	25,05	91,1	99,45
N100 ms	22,93	45,86	68,79	151,43	174,36
P150 ms	25,27	50,54	75,81	211,98	237,25

Tabella 21 – Calcolo delle deviazioni standard sui controlli sani.

Nella Tabella 22 sono riportate le differenze nella latenza delle componenti dei NEP dei pazienti con CANVAS rispetto ai valori di

media e deviazione standard dei sani. In particolare, la latenza delle componenti è stata considerata superiore al range di normalità quando superiore a media + 2 SD dei sani. La maggior parte delle componenti dei NEP risultava non registrabile nei pazienti con CANVAS.

Pz	P30 ms	N40 ms	P50 ms	N60 ms	P80 ms	N100 ms	P150 ms
G.T.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
A.F.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
A.M.	NR	NR	NR	NR	NR	Normale	NR
F.T.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
L.M.	>3 SD	>3 SD	>2 SD	>3 SD	Normale	Normale	Normale
F.O.	Normale	Normale	>2 SD	NR	NR	Normale	NR
M.S.	Normale	>2 SD	NR	Normale	NR	NR	NR
P.P.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
G.P.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
S.V.	>2 SD	Normale	Normale	NR	NR	NR	NR
G.C.	Normale	Normale	>2 SD	>3 SD	>3 SD	Normale	Normale
C.B.	>2 SD	>2 SD	>2 SD	NR	NR	Normale	Normale

Tabella 22 – Valutazione di quante e quali latenze ai NEP dei pazienti CANVAS risultano fuori dal range di normalità e di quanto. “NR” = Onda non rilevabile.

Quindi, per ogni onda dei NEP, questi sono i risultati:

P30: 6 NR, 1 >3 SD, 2 >2 SD, 3 Normali

N40: 6 NR, 1 >3 SD, 2 >2 SD, 3 Normali

P50: 7 NR, 4 >2 SD, 1 Normale

N60: 9 NR, 2 >3 SD, 1 Normale

P80: 10 NR, 1 > 3SD, 1 Normale

N100: 7 NR, 5 Normali

P150: 9 NR, 3 Normali

Dalla Tabella 22 si può notare che i pazienti CANVAS risultano per la maggior parte compromessi soprattutto nelle componenti precoci dei NEP. La maggior parte delle componenti precoci non è infatti registrabile in questi pazienti e, se registrabile, presenta spesso una latenza aumentata rispetto alla norma.

4.8 Compromissione dei portatori ATTRv presintomatici ai NEP

Per quanto riguarda i portatori ATTRv presintomatici, le differenze rispetto alla media e deviazione standard della popolazione sana di confronto sono riportate in Tabella 23.

Nome	P30	N40	P50	N60	P80	N100	P150
	ms	ms	ms	ms	ms	ms	ms
D.Do.	Normale	Normale	Normale	NR	Normale	Normale	Normale
D.Da.	Normale	Normale	>2 SD	NR	NR	Normale	Normale
A.L.	Normale	Normale	Normale	NR	NR	Normale	Normale
B.A.	Normale	Normale	Normale	Normale	Normale	Normale	Normale

Tabella 23 – Valutazione di quante e quali latenze ai NEP dei portatori ATTRv presintomatici risultano fuori dal range di normalità.

Abbiamo quindi potuto osservare che tra i soggetti presintomatici, nonostante non ci sia alcun segno clinico, esistono però dei NEP alterati e addirittura dei NEP non rilevabili, quindi delle onde non

elicitabili. In particolare, la risposta N60 risultava non registrabile in tre portatori presintomatici su 4.

P30: 4 Normali

N40: 4 Normali

P50: 1 >2 SD, 3 Normali

N60: 3 NR, 1 Normale

P80: 2 NR, 2 Normali

N100: 4 Normali

P150: 4 Normali

4.9 Correlazione tra NEP e scale CMTES e SARA nei pazienti CANVAS

Non è stata osservata alcuna correlazione significativa tra NEP e scale CMTES e SARA.

5. Discussione

5.1 Confronto tra PREP e NEP

I PREP (potenziali evocati dolore-correlati) costituiscono una metodica per lo studio delle piccole fibre piuttosto imprecisa, dal momento che si tratta di potenziali endogeni derivanti dall'attivazione di diverse aree corticali coinvolte nella processazione dello stimolo doloroso. Infatti, i PREP rappresentano una risposta al dolore già elaborata dalle componenti associative, e il punto di registrazione migliore per osservare queste componenti è il vertice del cranio (Cz). I PREP sono costituiti da risposte tardive; N1, N2 e P2 hanno infatti latenze molto più lunghe rispetto ai NEP. Vengono definiti potenziali endogeni proprio perché vanno a registrare la risposta ad uno stimolo dopo che questa è già stata elaborata dalle aree associative del soggetto.

Trattandosi di potenziali endogeni, i PREP risentono dell'*habitation* e della distrazione del paziente; in entrambe le situazioni si rileva una riduzione dell'ampiezza delle risposte. I NEP, invece, non risentono di questi fattori.

In particolare, i NEP costituiscono una risposta molto più precoce (le latenze delle risposte P30 ed N40 sono infatti molto più brevi). Il punto di registrazione (C3') si trova proprio in corrispondenza della rappresentazione somatotopica della mano a livello della corteccia somato-sensitiva primaria, perché lo scopo è quello di andare a registrare l'effetto diretto dello stimolo nocicettivo che arriva in corteccia, prima che possa essere elaborato dalle componenti associative. In particolare, si registra la risposta allo stimolo a livello della corteccia somato-sensitiva primaria controlaterale alla mano stimolata; noi abbiamo infatti stimolato la mano destra e registrato a livello dello scalpo di sinistra.

La differenza tra le due registrazioni, quindi, risiede nella possibilità, tramite i NEP, di registrare la nocicezione pura, senza coinvolgere anche altre elaborazioni associative.

5.1.1 CONFRONTO TRA PREP E NEP NEI PAZIENTI CANVAS

I pazienti CANVAS presentavano delle alterazioni significative soprattutto a carico delle componenti precoci (prima di N100), che erano spesso non registrabili oppure di latenza aumentata (Grafici 4-5-6). La latenza delle componenti tardive, valutate con i PREP, non era invece aumentata significativamente. Quindi possiamo affermare che i NEP, rappresentando la nocicezione pura e non essendo influenzati dal livello di attenzione del soggetto, risultano più specifici e più adatti dei PREP nell'indagare neurofisiologicamente la compromissione delle piccole fibre dei pazienti CANVAS.

5.1.2 CONFRONTO TRA PREP E NEP NEI SOGGETTI ATTRv PRESINTOMATICI

Come osservabile nella Tabella 23, anche nei portatori presintomatici di ATTRv sembra che le componenti dei NEP più compromesse siano quelle precoci, che risultano in alcuni casi non elicetabili e in altri casi con latenza aumentata. La differenza quindi tra controlli sani e portatori presintomatici di ATTRv sembra apprezzabile ai NEP e non ai PREP.

Questo potrebbe portarci a supporre che i NEP siano una valida metodica neurofisiologica, migliore dei PREP, per andare ad indagare le primissime manifestazioni di malattia nei soggetti ATTRv presintomatici.

5.2 Coinvolgimento delle piccole fibre nella CANVAS

Nonostante i primi gruppi di ricerca che si sono approcciati alla CANVAS pensassero che ci fosse un esclusivo interessamento delle fibre di grosso calibro⁶², questo nostro lavoro conferma invece l'importante coinvolgimento delle piccole fibre intraepidermiche in questi pazienti.

L'alterazione marcata nella densità di piccole fibre alla biopsia di cute era già stata resa evidente da altri studi, tramite un approccio più anatomico/morfologico⁸⁹, e il nostro lavoro conferma questi dati dal punto di vista neurofisiologico, ancora piuttosto inesplorato in letteratura.

Il coinvolgimento delle piccole fibre potrebbe spiegare i sintomi disautonomici riportati in Tabella 7 (il 25% dei pazienti aveva infatti ipotensione ortostatica sintomatica e il 25% stipsi cronica), le importanti alterazioni dei questionari CADT (Tabella 9) e COMPASS-31 (Tabella 10) e il frequente dolore neuropatico (Tabella 7). Anche la tosse secca, presente nella maggior parte dei pazienti CANVAS (67%), potrebbe essere dovuta a un interessamento di fibre di piccolo calibro, in particolare potrebbe trattarsi di una ipersensibilità da denervazione a livello di esofago e vie aeree superiori, che potrebbe elicitare il riflesso della tosse.

Le alterazioni significative dei NEP, soprattutto delle componenti precoci, rispetto ai soggetti sani, confermano la compromissione delle piccole fibre mieliniche A δ anche da un punto di vista neurofisiologico. Per quanto riguarda la funzione sudomotoria, valutata con il Sudoscan, circa il 60% dei pazienti presentava una riduzione della conduttanza elettrochimica cutanea, a suggerire un interessamento anche delle piccole fibre amieliniche C.

Infine, l'assenza di correlazione tra risultati ai NEP e scale CMTES e SARA, conferma il fatto che i NEP riflettano esclusivamente la funzione delle piccole fibre, perché queste scale indagano principalmente domini relativi alle fibre di più grande calibro, o addirittura domini cerebellari come nel caso della scala SARA. Quindi la non correlazione tra risultati dei NEP e risultati di queste scale è una conferma della selettività di questa indagine per le piccole fibre.

5.3 Possibile utilizzo dei NEP come marcatori di malattia nei portatori ATTRv presintomatici

Nell'ultimo decennio, le nuove terapie modificanti la malattia hanno migliorato significativamente la prognosi dell'ATTRv con polineuropatia, consentendo di prevenire o ritardare la progressione della malattia. Attualmente, non esiste un biomarcatore validato per il monitoraggio dei portatori presintomatici e la previsione della transizione verso la malattia clinicamente evidente. Secondo un recente consenso sul follow-up dei portatori presintomatici di ATTRv, l'insorgenza della malattia può essere confermata da due test diagnostici anomali in assenza di sintomi o segni clinici,⁹⁵ aprendo così la possibilità di un inizio veramente precoce di terapie modificanti la malattia. Diversi autori hanno suggerito che il monitoraggio dovrebbe iniziare 10 anni prima dell'età prevista di insorgenza della malattia sintomatica (PADO), e i NEP potrebbero rappresentare un'indagine adatta per seguire nel tempo i pazienti presintomatici. Sebbene non siano state osservate differenze significative nella latenza delle risposte precoci dei NEP tra portatori presintomatici e individui sani, è interessante notare

come tre su quattro portatori presintomatici avessero una risposta N60 non registrabile (Tabella 23). Questa rappresenta una delle risposte maggiormente riproducibili nei sani, quindi il dato è particolarmente interessante. Se questo risultato venisse confermato su una popolazione più ampia, i NEP potrebbero confermarsi una metodica utile per il riconoscimento precoce di un interessamento delle piccole fibre e potrebbero consentire di iniziare precocemente le terapie specifiche.

5.4 Limiti dello studio e prospettive future

Questo studio ha sicuramente dei limiti, in particolare la ridotta numerosità campionaria. Stiamo quindi continuando ad arruolare pazienti e sarà importante confermare i risultati su una casistica più ampia.

Manca inoltre un confronto con il dato morfologico, quindi con la densità di fibre nervose intraepidermiche. Abbiamo quindi intenzione di proporre ai pazienti una biopsia di cute per valutare anche questo parametro.

Un'altra criticità è rappresentata dalla differenza di età tra i diversi gruppi presi in esame. Comunque, come riportato in Tabella 20, non è stata osservata una correlazione tra l'ampiezza delle varie componenti dei NEP e l'età nei soggetti sani. Le differenze osservate tra pazienti CANVAS e sani non sembrano quindi attribuibili alla differenza di età tra i due gruppi, ma sembrano riflettere la compromissione delle piccole fibre nervose nel gruppo dei pazienti CANVAS.

6. Conclusioni

E' stata recentemente descritta una riduzione della densità di fibre nervose intraepidermiche nei pazienti con CANVAS.⁸⁹ Molti dei pazienti esaminati in questo studio presentavano inoltre sintomi suggestivi di un coinvolgimento delle fibre nervose di piccolo calibro, in particolare sintomi disautonomici, ipoestesia termica e/o dolore neuropatico. Dall'analisi dei nostri dati, si può concludere che il coinvolgimento delle piccole fibre nella CANVAS sia confermato anche da un punto di vista neurofisiologico e che lo studio dei potenziali evocati nocicettivi ottenuti dopo stimolazione con il nuovo elettrodo 150 IDE rappresenti una valida metodica per valutare questo coinvolgimento. Inoltre, si può affermare che i NEP siano molto più sensibili dei PREP nell'indagare le alterazioni funzionali delle piccole fibre, potendo analizzare le componenti più precoci delle risposte corticali, che risultano essere le più alterate nei pazienti affetti e non sono influenzate dal livello di attenzione del soggetto.

Porre una maggior attenzione sulla CANVAS e su altre neuropatie sensitive dell'età tardiva, ricercando nuove cause genetiche e dettagliando sempre di più le caratteristiche cliniche di queste sindromi, che fino a qualche anno fa erano sconosciute, potrebbe aiutare a chiarire tanti dubbi ancora esistenti sulle CIAP. Molte neuropatie ad oggi considerate idiopatiche, infatti, potrebbero un giorno avere un'eziologia chiara.

Infine, un valido spunto per il futuro potrebbe essere rappresentato dall'utilizzo dei NEP come marcatori precoci di malattia nei portatori ATTRv presintomatici, potendo consentire di iniziare precocemente le terapie mirate.

7. Bibliografia

1. Loeb, C. & Favale, E. *Neurologia di Fazio Loeb* (Società Editrice Universo; 2003).
2. Anastasi, G., Capitani, S., Carnazza, M. L., Cinti, S., Cremona, O., De Caro, R., Donato, R. F., Ferrario, V. F., Fonzi, L., Franzi, A. T., Gaudio, E., Geremia, R., Giordano Lanza, G., Grossi, C. E., Gulisano, M., Manzoli, F. A., Mazzotti, G., Michetti, F., Miscia, S., Mitolo, V., Montella, A. Orlandini, G., Paparelli, A., Renda, T., Ribatti, D., Ruggeri, A., Sirigu, P., Soscia, A., Tredici, G., Vitale, M., Zaccheo, D., Zauli, G., Zecchi, S. *Trattato di Anatomia Umana-Volume terzo* Quarta Edizione (Edi-Ermes; 2006-2007).
3. Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. & Aster, J. Nervo periferico e muscolo scheletrico. In *Robbins e Cotran, le basi patologiche delle malattie* 1244-1253 (Elsevier Srl; 2010).
4. Castelli, G., Desai, K., Cantone, R. *Peripheral Neuropathy: Evaluation and Differential Diagnosis* (American Family Physician 732-739; 2020).
5. Watson, J. C. & Dyck, P. J. B. *Peripheral Neuropathy: A Practical Approach to Diagnosis and Symptom Management*. (Mayo Clinic Proceedings 90, 940–951; 2015).
6. McLeod, J. G. *Investigation of peripheral neuropathy*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 58, 274–283 (1995).
7. Azhary, H., Farooq, M.U., Bhanushali, M., et al. *Peripheral neuropathy: differential diagnosis and management*. (American Family Physician 81(7):887-892; 2010).
8. England, J. D., Asbury A.K. *Peripheral neuropathy* (The Lancet, Volume 363, Issue 9427, 2151-2161; 2004).
9. Burns, T. M. & Mauermann, M. L. *The evaluation of polyneuropathies* (Neurology 76; 2011).

10. Vallat, J., Weis, J., Gray, F. & Keohane, K. *Clinical assessment and classification of peripheral nerve diseases*. (Peripheral Nerve Disorders: Pathology and Genetics 1–11; John Wiley & Sons, Ltd, 2014).
11. Naqvi, U., Sherman, A.I. *Muscle strength grading* (StatPearls. Accessed February 17, 2019).
12. England, J. D. *et al.* Practice Parameter: Evaluation of distal symmetric polyneuropathy: Role of laboratory and genetic testing (an evidence-based review): Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and Am. *Neurology* 72, 185– 192 (2009).
13. Lindenbaum, J., Savage, D. G., Stabler, S. P. & Allen, R. H. Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am. J. Hematol.* 34, 99–107 (1990).
14. Savage, D. G., Lindenbaum, J., Stabler, S. P. & Allen, R. H. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am. J. Med.* 96, 239–46 (1994).
15. Gilliatt, R.W. *Nerve conduction in human and experimental neuropathies*. Proceedings of the Royal Society of Medicine (59:989-93; 1966).
16. Logigian, E.L., Kelly, J., Adelman, S. *Nerve conduction and biopsy correlation in over 100 consecutive patients with suspected polyneuropathy*. *Muscle Nerve* (17:101-20; 1994).
17. Kaku, D. A., Parry, G. J., Malamut, R., Lupski, J. R. & Garcia, C. A. Uniform slowing of conduction velocities in Charcot-Marie-Tooth polyneuropathy type 1. *Neurology* 43, 2664–7 (1993).
18. Gabreëls-Festen, A. A. *et al.* Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy or hereditary motor and sensory

- neuropathy? Diagnostic value of morphological criteria. *Acta Neuropathol.* 86, 630–5 (1993).
19. Lewis, R. A. & Sumner, A. J. The electrodiagnostic distinctions between chronic familial and acquired demyelinating neuropathies. *Neurology* 32, 592–6 (1982).
 20. Barohn, R. J., Kissel, J. T., Warmolts, J. R. & Mendell, J. R. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Clinical characteristics, course, and recommendations for diagnostic criteria. *Arch. Neurol.* 46, 878–84 (1989).
 21. Daube, J.R. *Nerve conduction studies* In Aminoff M, ed. *Electrodiagnosis in clinical neurology*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone (283-326; 1992).
 22. Kimura, J. *Nerve conduction studies and electromyography*. In: Dyck, P.J., Thomas, P.K., Low, P.A., Griffin, J.W., Poduslo, J.F., eds. *Peripheral neuropathy*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders (598-644, 1993).
 23. Cornblath, D.R., Sumner, A.J., Daube, G., Gilliatt, R.W., Brown, W.F., Parry, G.J., et al *Conduction block in clinical practice*. *Muscle Nerve* (14:869-71; 1991).
 24. Cornblath, D.R. *Electrophysiology in Guillain-Barré syndrome*. *Ann Neurol* (27: S17-20, 1990).
 25. Asbury, A.K., Cornblath, D.R. *Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome*. *Ann Neurol* (27:S21-4; 1990).
 26. Sumner, A.J. *Electrophysiology of the inflammatory demyelinating polyneuropathies* In: McLeod, J.G., ed. *Inflammatory neuropathies*. Bailliere's Clinical Neurology 3:1. (London: Bailliere Tindall, 25-44; 1994).
 27. McLeod, J.G., Prineas, J.W., Walsh, J.C. *The relationship of conduction velocity to pathology in peripheral nerves: a study of the sural nerve in 90 patients*. In: Desmedt, J.E., ed. New

- developments in electromyography and clinical neurophysiology. Vol 2. Basel: Karger (248-58; 1973).
28. Barohn, R. J., *Approach to peripheral neuropathy and neuronopathy*. Semin. Neurol. 18, 7–18 (1998).
 29. McLeod, J.G., Wray, S.H., *An experimental study of the F-wave in the baboon*. Jf Neurol Neurosurg Psychiatry (29:196-200; 1966).
 30. Kiers, L., Clouston, P., Zuniga, G. & Cros, D. *Quantitative studies of F responses in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 93, 255–64 (1994).
 31. Yiannikas, C. & Vucic, S. *Utility of somatosensory evoked potentials in chronic acquired demyelinating neuropathy*. Muscle Nerve 38, 1447–1454 (2008).
 32. Willison, H. J. *Clinical Evaluation and Investigation of Neuropathy*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74, 3ii–8 (2003).
 33. Lacomis, D. *Small-fiber neuropathy*. Muscle Nerve 26, 173–188 (2002).
 34. Hughes, R.A.C. *Guillain-Barré syndrome*. Heidelberg: Springer-Verlag (1990).
 35. McLeod, J.G., Walsh, J.C., Prineas, J.W., Pollard, J.D. *Acute idiopathic polyneuritis. A clinical and electrophysiological study*. J Neurol Sci; 27:145-62 (1976).
 36. Ropper, A.H., Wijdicks, E.F.M., Truax, B.T. *Guillain-Barré syndrome*. Philadelphia: FA Davis (1991).
 37. Van den Bergh, P.Y.K., van Doorn, P.A., Hadden, R.D.M., Avau, B., Vankrunkelsven, P., Allen, J.A., Attarian, S., Blomkwist-Markens, P.H., Cornblath, D.R., Eftimov, F., Goedee, H.S., Harbo, T., Kuwabara, S., Lewis, R.A., Lunn, M.P., Nobile-Orazio, E., Querol, L., Rajabally, Y.A., Sommer, C., Topaloglu, H.A. *European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society guideline on diagnosis and treatment of chronic inflammatory*

- demyelinating polyradiculoneuropathy: *Report of a joint Task Force-Second revision*. (Eur J Neurol. 2021 Nov;28(11):3556-3583. Epub 2021 Jul 30).
38. Rinaldi, R., Patel, A. *Inherited Polyneuropathies*, Electrodiagnostic and clinical correlates (S63-S73; 2013).
 39. Schenone, A., Mancardi, G.L. *Molecular basis of inherited neuropathies* – Curr Opin Neurol: 12(5) 603-16 (1999).
 40. Harding, A.E., Thomas, P.K. *The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II* – Brain 103 (2): 259-80 (1980).
 41. Dyck, P.J. *Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory and autonomic neurons* – Dyck P.J., Griffin P.A. Low & J.F. Poduslo (Eds) *Peripheral Neuropathy Vol 2* 1557-1598, Philadelphia: WB Saunders (1993).
 42. Schenone, A., Gherardi, G., Ansaldo, G.L., et al. *La biopsia del nervo nella pratica clinica*. Trattato di Neuropatologia. Mancardi, G.L, Tagliavini, F., Vita, G. Contatto & Archimedita (Torino, 2007).
 43. Flachener, P., Janka, M., Goldbrunner, R., et al. *Clinical outcome of sural nerve biopsy: a retrospective study*. J Neurol 246 (2): 93-6 (1999).
 44. Prada, V., Massucco, S., Venturi, C., Geroldi, A., Bellone, E., Mandich, P., Minuto, M., Varaldo, E., Mancardi, G., Grandis, M., Schenone, A. *Diagnostic Value of Sural Nerve Biopsy: Retrospective Analysis of Clinical Cases From 1981 to 2017*. (Front Neurol. 2019 Nov 22;10:1218).
 45. Lauria, G., Cornblath, D.R., Johansson, O., et al. *EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy*. Eur J Neurol 12(10): 747-58. (2005).
 46. Lauria, G., Hsieh, S.T., Johansson, O., et al. *European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society*

- Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy*. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral nerve Society. *Eur J Neurol* 17(7): 903-12, e44-9 (2010).
47. Arnold, N., Harriman, D.G. *The incidence of abnormality in control human peripheral nerves studied by single axon dissection*. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 33:55–61 (1970).
48. Low, P.A., Dyck, P.J. *Splanchnic preganglionic neurons in man. III. Morphometry of myelinated fibers of rami communicantes*. *J Neuropathol Exp Neurol* 37:734–740 (1978).
49. Vrancken, A.F.J.E., Franssen, H., Wokke, J.H.J. et al. *Chronic idiopathic axonal polyneuropathy and successful aging of the peripheral nervous system in elderly people*. *Arch Neurol* 59:533–540 (2002).
50. Goble, D.J., Coxon, J.P., Wenderoth, N. et al. *Proprioceptive sensibility in the elderly: degeneration, functional consequences and plastic-adaptive processes*. *Neurosci Biobehav Rev* 33:271–278 (2009).
51. Suetterlin, K.J., Sayer, A.A. *Proprioception: where are we now? A commentary on clinical assessment, changes across the life course, functional implications and future interventions*. *Age Ageing* 43:313–318 (2014).
52. Clark, B.C., Manini, T.M. *What is dynapenia?* *Nutrition* 28:495–503 (2012).
53. Löscher, W.N., Iglseder, B. *Polyneuropathie im Alter*. *Internist* 61, 254–260 (2020).
54. Hanewinkel, R., Drenthen, J., Verlinden, V.J.A. et al. *Polyneuropathy relates to impairment in daily activities, worse gait, and fall-related injuries*. *Neurology* 89:76–83 (2017).
55. Hanewinkel, R., van Oijen, M., Ikram, M.A., Van Doorn, P.A. *The epidemiology and risk factors of chronic polyneuropathy*. *Eur J Epidemiol* 31:5–20 (2016).

56. Taylor, P.K. *Non-linear effects of age on nerve conduction in adults*. J Neurol Sci 66:223–234 (1984).
57. Vrancken, A.F.J.E., Notermans, N.C., Wokke, J.H.J., Franssen, H. *The realistic yield of lower leg SNAP amplitudes and SRAR in the routine evaluation of chronic axonal polyneuropathies*. J Neurol 255:1127–1135 (2008).
58. Singer, M.A., Vernino, S.A., Wolfe, G.I. *Idiopathic neuropathy: new paradigms, new promise*. J Peripher Nerv Syst 17(Suppl 2):43–49 (2012).
59. Visser, N.A., Vrancken, A.F.J.E., van der Schouw, Y.T. et al. *Chronic idiopathic axonal polyneuropathy is associated with the metabolic syndrome*. Diabetes Care 36:817–822 (2013).
60. Shy, M.E. Neurology Volume 95, Number 24, Pages: 1071-1073. (December 15, 2020).
61. Senderek, J., Lassuthova, P., Kabzińska, D., et al. *The genetic landscape of axonal neuropathies in the middle-aged and elderly: focus on MME*. Neurology; 95:e3163–e3179 (2020).
62. Cortese, A., Simone, R., Sullivan, R., et al. *Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia*. Nat Genet; 51:649–658 (2019).
63. Hoffman, E.M., Staff, N.P., Robb, J.M., St Sauver, J.L., Dyck, P.J., Klein, C.J. *Impairments and comorbidities of polyneuropathy revealed by population-based analyses*. Neurology; 84:1644–1651 (2005).
64. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., et al. *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med; 17:405–424 (2015).
65. Suzuki, M. *Peripheral neuropathy in the elderly*. Handb Clin Neurol; 115:803-13 (2013).

66. Richardson, J.K. *The clinical identification of peripheral neuropathy among older persons*. Arch Phys Med Rehabil 83: 1553–1558 (2002).
67. Cortese, A., Reilly, M. M., Houlden, H. *RFC1 CANVAS / Spectrum Disorder*. GeneReviews (2020).
68. Magy, L. et al. *Early Diagnosis in Cerebellar Ataxia, Neuropathy, Vestibular Areflexia Syndrome (CANVAS) by Focusing on Major Clinical Clues: Beyond Ataxia and Vestibular Impairment*. Biomedicines 10, 2046 (2022).
69. Umeh, C. C., Polydefkis, M., Chaudhry, V., Zee, D. S. *Sweat Gland Denervation in Cerebellar Ataxia with Neuropathy and Vestibular Areflexia Syndrome (CANVAS)*. Mov Disord Clin Pract 4, 46–48 (2016).
70. Cortese, A., Tozza, S., Yau, W.Y., Rossi, S., Beecroft, S.J., Jaunmuktane, Z., Dyer, Z., Ravenscroft, G., Lamont, P.J., Mossman, S., Chancellor, A., Maisonnobe, T., Pereon, Y., Cauquil, C., Colnaghi, S., Mallucci, G., Currò, R., Tomaselli, P.J., Thomas-Black, G., Sullivan, R., Efthymiou, S., Rossor, A.M., Laurá, M., Pipis, M., Horga, A., Polke, J., Kaski, D., Horvath, R., Chinnery, P.F., Marques, W., Tassorelli, C., Devigili, G., Leonardis, L., Wood, N.W., Bronstein, A., Giunti, P., Züchner, S., Stojkovic, T., Laing, N., Roxburgh, R.H., Houlden, H., Reilly, M.M. *Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome due to RFC1 repeat expansion*. Brain; 143:480–90 (2020).
71. Pelosi, L., Mulroy, E., Leadbetter, R., Kilfoyle, D., Chancellor, A.M., Mossman, S., Wing, L., Wu, T.Y., Roxburgh, R.H. *Peripheral nerves are pathologically small in cerebellar ataxia neuropathy vestibular areflexia syndrome: a controlled ultrasound study*. Eur J Neurol; 25:659–65 (2018).
72. Nakamura, H., Doi, H., Mitsuhashi, S., Miyatake, S., Katoh, K., Frith, M.C., Asano, T., Kudo, Y., Ikeda, T., Kubota, S., Kunii, M.,

- Kitazawa, Y., Tada, M., Okamoto, M., Joki, H., Takeuchi, H., Matsumoto, N., Tanaka, F. *Long-read sequencing identifies the pathogenic nucleotide repeat expansion in RFC1 in a Japanese case of CANVAS*. *J Hum Genet*; 65:475–80 (2020).
73. Manganelli, F., Fabrizi, G.M., Luigetti, M., Mandich, P., Mazzeo, A., Pareyson, D. *Hereditary transthyretin amyloidosis overview*. *Neurol Sci*; 43(Suppl 2):595-604 (December 2022).
74. Dyck, P.J., Lambert, E.H. *Dissociated sensation in amyloidosis. Compound action potential, quantitative histologic and teased-fiber, and electron microscopic studies of sural nerve biopsies*. *Arch Neurol*; 20(05):490–507 (1969).
75. Thomas, P.K., King, R.H. *Peripheral nerve changes in amyloid neuropathy*. *Brain*; 97(02):395–406 (1974).
76. Kaku, M., Berk, J.L. *Neuropathy Associated with Systemic Amyloidosis*. *Semin Neurol*; 39(5):578-588 (October 2019).
77. Planté-Bordeneuve, V., Lalu, T., Misrahi, M., et al. *Genotypic-phenotypic variations in a series of 65 patients with familial amyloid polyneuropathy*. *Neurology*; 51(03):708–714 (1998).
78. Adams, D., Samuel, D., Goulon-Goeau, C., et al. *The course and prognostic factors of familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation*. *Brain*; 123(Pt 7):1495–1504 (2000).
79. Benson, M.D., Kincaid, J.C. *The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy*. *Muscle Nerve*; 36(04):411–423 (2007).
80. Théaudin, M., Lozeron, P., Algalarrondo, V., et al. *Upper limb onset of hereditary transthyretin amyloidosis is common in non-endemic areas*. *Eur J Neurol*; 26(03):497–e36 (2019).
81. Yang, N.C., Lee, M.J., Chao, C.C., et al. *Clinical presentations and skin denervation in amyloid neuropathy due to transthyretin Ala97- Ser*. *Neurology*; 75(06):532–538 (2010).
82. Lefaucheur, J.P., Ng Wing Tin, S., Kerschen, P., Damy, T., Planté- Bordeneuve, V. *Neurophysiological markers of small*

- fibre neuropathy in TTR-FAP mutation carriers. J Neurol*; 260 (06):1497–1503 (2013).
83. Simmons, Z., Blaivas, M., Aguilera, A.J., Feldman, E.L., Bromberg, M.B., Towfighi, J. *Low diagnostic yield of sural nerve biopsy in patients with peripheral neuropathy and primary amyloidosis. J Neurol Sci*; 120(01):60–63 (1993).
84. Buxbaum, J.N., Tagoe, C.E. *The genetics of the amyloidoses. Annu Rev Med*; 51:543–569 (2000).
85. Schilling, M. *Gene therapy options for hereditary transthyretin-related amyloidosis. Nervenarzt*; 93(6):557-565 (June, 2022).
86. Leandri, M., Marinelli, L., Siri, A., Pellegrino, L. *Micropatterned surface electrode for massive selective stimulation of intraepidermal nociceptive fibres. J Neurosci Methods* 293, 17–26 (2018).
87. Tagliapietra, M., Incensi, A., Ferrarini, M., Mesiano, N., Furia, A., Rizzo, G., Liguori, R., Cavallaro, T., Monaco, S., Fabrizi, G.M., Donadio, V. *Clinical and pathology characterization of small nerve fiber neuro(no)pathy in cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndrome. Eur J Neurol*. 2023 Dec;30(12):3834-3841.
88. Mazzone, S.B., Farrell, M.J. (2019) *Heterogeneity of cough neurobiology: Clinical implications. Pulm Pharmacol Ther* 55:62–66.
89. Magy, L., Chazelas, P., Richard, L., et al (2022) *Early Diagnosis in Cerebellar Ataxia, Neuropathy, Vestibular Areflexia Syndrome (CANVAS) by Focusing on Major Clinical Clues: Beyond Ataxia and Vestibular Impairment. Biomedicines* 10.
90. Leandri, M., Di Stefano, G., Truini, A., Marinelli, L. *Early nociceptive evoked potentials (NEPs) recorded from the scalp. Clin Neurophysiol* 132, 2896–2906 (2021).
91. Lauria, G., Merkies, I. S. J., Faber, C. G. *Small fibre neuropathy. Curr Opin Neurol* 25, 542–549 (2012).

92. Denier, C. et al. *A brief compound test for assessment of autonomic and sensory-motor dysfunction in familial amyloid polyneuropathy*. *J Neurol* 254, 1684–1688 (2007).
93. Treister, R., O’Neil, K., Downs, H. M., Oaklander, A. L. *Validation of the composite autonomic symptom scale 31 (COMPASS-31) in patients with and without small fiber polyneuropathy*. *Eur J Neurol* 22, 1124–1130 (2015).
94. Moya, A. et al. *Guidelines: Guidelines for the diagnosis and management of syncope (version 2009): The Task Force for the Diagnosis and Management of Syncope of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J* 30, 2631 (2009).
95. Conceição, I. et al. *Early diagnosis of ATTR amyloidosis through targeted follow-up of identified carriers of TTR gene mutations*. *Amyloid* 26, 3–9 (2019).

8. Ringraziamenti

Prima di chiunque altro voglio ringraziare tutti i pazienti che hanno reso possibile questo studio, in particolare i pazienti CANVAS della Clinica Neurologica del San Martino. Mai più mi sarei aspettata di trovare così tanta adesione, partecipazione, curiosità ed entusiasmo.

Ricorderò ognuno di voi, e il connubio di consapevolezza e speranza che vi contraddistingue.

Ringrazio il prof Schenone per aver notato il mio interesse per la neurologia e per averlo coltivato proponendomi un lavoro così interessante. Prendere parte a questo progetto è stato molto gratificante per me, grazie per questa opportunità. Ne avrò sempre un bellissimo ricordo.

Un ringraziamento speciale va alla dottoressa Massucco, per me semplicemente Sara, che è stata indispensabile in tutti questi mesi. Senza di lei sarebbe stato impossibile portare a termine questo studio, è stata per me un faro, una guida.

Ambisco, un giorno, ad essere un medico simile a lei: competente, paziente e soprattutto sempre gentile e disponibile con pazienti e colleghi. Grazie di cuore Sara, sono fortunata ad averti avuta al mio fianco in questo percorso.

Ringrazio il prof Leandri per averci aperto le porte del suo laboratorio, per aver avuto la pazienza di insegnarmi le basi minime di fisica ed elettronica per poter comprendere le fondamentali tecniche su cui si basa questo studio, e per aver condiviso con noi i prodotti della sua mente geniale. Grazie per averci dedicato il suo tempo.

Ringrazio la dott.ssa Stara per averci aiutate con le registrazioni dei potenziali, il prof. Marinelli e la mia collega, e amica, Silvia e tutti gli altri controlli sani che si sono resi disponibili per questo studio.

Ringrazio con tutta me stessa la mia famiglia e i miei amici, siete il sole che scalda le mie giornate, il centro del mio universo e il motore di tutto quello che faccio.