

Università degli Studi di Pisa



Facoltà di Medicina e Chirurgia

**Profilo clinico e biochimico in
un nuovo quadro di Ritardo
Mentale X-linked da deficit
primario di Creatina**

Candidato:
Margherita Bozza

Relatore:
Chiar.mo Prof. G. Cioni

Anno Accademico 2005-2006

*Alla mia famiglia
Al mio amore*

Riassunto

Il Ritardo Mentale (RM) è una patologia molto comune nei bambini e negli adolescenti e nel 5-12% dei casi è dovuto a mutazioni genetiche presenti sul cromosoma X, RM X-linked (XLMR). In questo studio abbiamo voluto raccogliere gli aspetti principali delle sindromi più importanti analizzando le funzioni dei geni mutati, descrivendo le caratteristiche fisiche e gli aspetti dismorfici, il tipo di RM e le anomalie neurologiche e del comportamento che le contraddistinguono. Abbiamo inoltre descritto il protocollo diagnostico che attraverso la raccolta della storia clinica, l'esame obiettivo e le indagini biochimiche e strumentali consenta di individuare il gene più probabilmente mutato. Tra le varie sindromi legate al XLMR ci siamo soffermati su quella recentemente identificata causata da mutazioni del gene SLC6A8. Essa è responsabile del deficit del Trasportatore della Creatina (Cr), uno degli errori congeniti del metabolismo della Cr insieme ai deficit di Sintesi della Cr: deficit degli enzimi Arginina-Glicina Amidinotransferasi (AGAT) e Guanidinoacetato Metiltransferasi (GAMT). Tale sindrome è stata diagnosticata in un paziente giunto in osservazione all'Istituto Scientifico Stella Maris con un quadro di RM di grado medio con compromissione del linguaggio associato ad impaccio motorio ed epilessia. Le indagini biochimiche hanno evidenziato dosaggi di Cr, Crn e GAA compatibili con un deficit del Trasportatore e l'1H-RMS ha mostrato l'assenza del picco di Cr cerebrale. L'ipotesi diagnostica è stata confermata dall'analisi genetico-molecolare che ha evidenziato la presenza di una nuova mutazione (Asn336del) nella proteina SLC6A8 assente nei familiari indagati (*de novo*).

Indice

Prefazione	4
Introduzione	6
1 Ritardo mentale X-linked	8
1.1 Definizione e classificazione del ritardo mentale	8
1.2 Fattori etiopatogenetici	10
1.3 Ritardo mentale legato al cromosoma X	11
1.4 XLMR sindromico e non sindromico	14
1.5 Principali sindromi legate al XLMR	15
1.5.1 Sindrome dell'X fragile	15
1.5.2 Sindrome di Rett	19
1.5.3 Alfa talassemia e ritardo mentale X-linked	22
1.5.4 Sindrome di Coffin-Lowry	25
1.5.5 Sindrome da mutazione del gene ARX	27
1.5.6 Sindrome da mutazione del gene OPHN1	28
1.5.7 Sindrome di Allan-Herndon-Dudly	29
1.5.8 Sindrome di Renpenning	30
1.5.9 Sindrome di Aarskog-Sott	31
1.5.10 Sindrome da mutazione del gene JARID1C	32
1.5.11 Deficit del trasportatore di Creatina	33
1.6 Protocollo diagnostico di XLMR	33

<i>Indice</i>	3
2 SLC6A8: un nuovo errore congenito del metabolismo della Creatina	39
2.1 Metabolismo della Creatina	40
2.2 Deficit di sintesi	42
2.2.1 Quadro clinico	42
2.2.2 Pattern biochimico e spettroscopico	43
2.2.3 Mutazioni genetiche	44
2.2.4 Terapia	46
2.3 Deficit del Trasportatore	48
2.3.1 Quadro clinico	48
2.3.2 Pattern biochimico e spettroscopico	55
2.3.3 Mutazioni genetiche	57
2.3.4 Terapia	58
3 Parte sperimentale	59
3.1 Descrizione del paziente	59
3.1.1 Quadro clinico	59
3.1.2 Diagnostica neurochimica e genetica	63
3.1.3 Profilo neuropsicologico	64
3.2 Ipotesi di trattamento	67
Conclusioni	68
Prospettive future	70
Riferimenti bibliografici	72
Elenco delle figure	85
Elenco degli acronimi	86

Prefazione

Il ritardo mentale X-linked (XLMR) è una condizione eterogenea che rappresenta il 5-12 % delle cause di ritardo mentale (RM). Numerosi pazienti affetti da tale patologia con delle specifiche caratteristiche fenotipiche e genotipiche sono stati descritti negli ultimi anni; tuttavia, nonostante le acquisizioni scientifiche in continuo aumento, molti di questi pazienti rimangono tuttora senza una diagnosi molecolare specifica. In generale, manca una traduzione delle acquisizioni scientifiche nella corrente pratica diagnostica. In particolare, quasi mai viene effettuata una analisi mutazionale dei geni che sono stati identificati per l'elevato numero di essi.

Lo *scopo* del presente lavoro è stato quello di:

Descrivere in generale il XLMR. La definizione, la classificazione e la distinzione tra XLMR sindromico e XLMR non sindromico, forniscono delle informazioni importanti per un primo approccio a questo argomento.

Descrivere le sindromi più importanti legate a XLMR. In letteratura numerosi sono i casi descritti di pazienti affetti da XLMR, ma in questo studio abbiamo voluto raccogliere le principali caratteristiche delle sindromi più importanti. Partendo dalle mutazioni dei geni del cromosoma X coinvolti e dalle loro funzioni all'interno delle cellule nervose abbiamo descritto le caratteristiche fisiche, il tipo di RM e le anomalie neurologiche e del comportamento peculiari delle diverse sindromi.

Descrivere l'iter diagnostico del XLMR. Integrando le varie informazioni derivanti dall'analisi della storia familiare e personale del paziente, dalla descrizione del suo quadro clinico e con l'esecuzione di alcuni esami di laboratorio e strumentali si può individuare il singolo gene più probabilmente mutato.

Descrivere il deficit del Trasportatore della Creatina. Tra le varie sindromi legate al XLMR ci siamo soffermati su quella causata da mutazioni del gene SLC6A8, recentemente diagnosticata in un paziente presso l'Istituto Stella Maris e che è stato oggetto della parte sperimentale di questo lavoro. Abbiamo voluto intraprendere un studio di questa sindrome allo scopo di:

- confrontare dal punto di vista clinico e biochimico il deficit del Trasportatore con quelli di GAMT e di AGAT precedentemente descritti tra i quadri di deficit di creatina;
- conoscere meglio il fenotipo clinico del deficit del Trasportatore attraverso la descrizione dei vari casi riportati in letteratura e del paziente individuato presso il nostro Istituto.

Introduzione

Già nella prima metà del secolo scorso diversi studi hanno riportato una maggiore incidenza di maschi tra i pazienti istituzionalizzati per ritardo mentale (RM). Nel 1931 Lionel Penrose pubblicò una ricerca condotta su 1280 pazienti istituzionalizzati e osservò che il rapporto tra maschi e femmine era di 1,25:1. Egli attribuì questo risultato ad errori di accertamento e al fatto che le ragazze venivano più frequentemente tenute in casa e più raramente istituzionalizzate ed erano quindi meno rappresentate nel gruppo di pazienti studiati [1]. Molti anni dopo, nel 1970, Lehrke analizzò un altro gruppo di pazienti che comprendeva anche 5 casi famigliari e oltre a confermare l'eccesso di maschi tra gli affetti da RM, osservò che nelle famiglie il RM era trasmesso come un gene legato al cromosoma X [2]. Queste ipotesi sono state confermate da numerosi studi successivi eseguiti in Canada, Australia, USA, Europa che dimostrarono un eccesso del 30% tra i maschi affetti dal RM. Gli studi di Martin e Bell, pubblicati nel 1943, portarono solo nel 1991 all'identificazione del primo gene mutato responsabile del RM nella Sindrome dell'X-Fragile [3]. Da allora numerosi geni responsabili del RM localizzati sul cromosoma X sono stati identificati soprattutto negli ultimi anni grazie agli eccezionali sviluppi delle tecniche di clonaggio posizionale e la caratterizzazione di riarrangiamenti cromosomici che hanno contribuito a ridurre fortemente la regione cromosomica in cui cercare il gene di interesse. L'aumentare dell'informazione sulla sequenza del DNA ha permesso di caratterizzare dettagliatamente le regioni critiche e identificare i geni candidati. Successivi studi di associazione hanno permesso di considerare insieme famiglie diffe-

renti i cui membri presentavano le stesse mutazioni descrivendo così diverse sindromi in cui il RM si associa ad altri sintomi e segni tipici della sindrome o è presente isolatamente.

Tra le varie sindromi legate al RM X-linked, quella causata da mutazioni del gene SLC6A8 è responsabile del Deficit del Trasportatore di Cr, un errore congenito del metabolismo energetico della Cr recentemente descritto insieme ai deficit di sintesi della Cr (deficit degli enzimi AGAT e GAMT). Il recente interesse per il metabolismo della Cr ha portato ad approfondire le ricerche sulle sue funzioni sia nei soggetti normali sia in condizioni patologiche. Già nel 1832 il francese Chevreul aveva riferito della scoperta di un nuovo costituente organico della carne a cui diede il nome di Cr. Tuttavia, a causa di difficoltà concernenti i metodi di ottenimento della Cr stessa, solo nel 1847 Lieberg fu in grado di confermare che la Cr era un normale costituente della carne. Nel 1928 Hunter scrisse in un suo lavoro che probabilmente la Cr non era un semplice prodotto di scarto, ma un costituente tissutale essenziale con funzioni speciali [4]. Nel corso di studi successivi si attribuì alla fosfocreatina, infatti, un ruolo chiave nel metabolismo del muscolo scheletrico e nello stesso periodo Heintz e Pettenkofer evidenziarono nelle urine una sostanza che poi Lieberg confermò essere la creatinina (Crn). Sulla base dell'osservazione che l'escrezione urinaria della Crn era correlata all'entità della massa muscolare, fu ipotizzato che essa fosse un diretto prodotto di metabolizzazione dalla Cr localizzata nei muscoli. Nonostante le numerose pubblicazioni sul ruolo della Cr nel metabolismo energetico e sui suoi meccanismi di trasporto, poca attenzione è stata rivolta a questi argomenti nel campo della clinica. Fino a poco tempo fa, infatti, elevate concentrazioni urinarie e plasmatiche di Crn sono state utilizzate come marker di alterata funzione renale. Dal 1994, con la scoperta del primo caso di difetto ereditario di sintesi di Cr [5], anche basse concentrazioni di Crn sono diventate un marker di malattia. Grazie all'applicazione della Spettroscopia Protonica in Risonanza Magnetica (^1H -RMS) nella diagnostica clinica è stato possibile identificare il deficit primario di Cr cerebrale .

Capitolo 1

Ritardo mentale X-linked

1.1 Definizione e classificazione del ritardo mentale

Il ritardo mentale (RM) è una patologia molto comune ed è probabilmente l'handicap più frequente nei bambini e negli adolescenti. Le stime epidemiologiche circa la prevalenza del RM nella popolazione generale riportano valori variabili dall'1% al 3%. L'incidenza inoltre varia con l'età: è più bassa in età pre-scolare ed adulta, ed è massima nel corso dell'età scolare, in quanto le richieste scolastiche fungono generalmente da rivelatore del RM [6].

Possiamo parlare di RM, come definito dall'American Association on Mental Retardation (AAMR) [7], quando assistiamo alla presenza di:

- Deficit intellettivo generale significativamente al di sotto della media.
- Disturbo significativo delle capacità di adattamento in almeno due delle seguenti aree: comunicazione, cura di se, vita in famiglia, capacità sociali e interpersonali, uso delle risorse della comunità, autodeterminazione, capacità del funzionamento scolastico, lavoro, tempo libero, salute e sicurezza. Quando due delle suddette aree risultano intaccate, ecco che possiamo diagnosticare una difficoltà di tipo adattivo.

- Insorgenza prima dei 18 anni.

Per la valutazione quantitativa delle capacità intellettive, possono essere usate le Scale Wechsler che consentono una determinazione del Quoziente Intellettivo Totale (QIT), ma anche del Quoziente Intellettivo Verbale (QIV) e di Performance (QIP). Esistono tre tipi di scale Wechsler, a seconda dell'età del soggetto: la *Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence* (WPPSI) per bambini da 4 a 6 anni, la *Wechsler Intelligence Scale for Children - Revised* (WISC-R) per soggetti da 6 a 16 anni e la *Wechsler Adult Intelligence Scale* (WAIS5) solitamente applicata per adolescenti ed adulti di età superiore a 16 anni. Non sempre è possibile testare un soggetto con le scale Wechsler, specialmente se le capacità verbali sono molto deficitarie. In questi casi può essere usata la *Leiter International Performance Scale*, eseguibile già in età prescolare. Per bambini ancora più piccoli possono essere utilizzati strumenti che valutano il livello di sviluppo quali la *Griffiths Developmental Scales*. Per essere significativo di RM vi deve essere una caduta del quoziente intellettivo di almeno due deviazioni standard rispetto alla norma; questo corrisponde ad un quoziente di intelligenza (QI) < 70. Per quanto riguarda le capacità adattative alle esigenze di un ambiente sociale normale, la valutazione può basarsi su informazioni raccolte da fonti diverse, per esempio, valutazioni degli insegnanti, sviluppo e storia clinica che però sono meno oggettive e sull'uso della *Scala Vineland*.

Il criterio classificativo più usato nel RM è quello psicometrico. Vengono distinte fasce di gravità cui corrispondono profili clinici relativamente differenziati. Secondo l'ICD-10, maggiormente usato nel Regno Unito [8], e secondo il DSM-IV, più utilizzato negli USA [9], vengono distinti quattro livelli di gravità sulla base del QI:

- RM lieve: da 50-55 a circa 70;
- RM medio: da 35-40 a 50-55;
- RM grave: da 20-25 a 35-40;
- RM gravissimo (o profondo): inferiore a 20-25.

Inizialmente esisteva un quinto grado, vale a dire il borderline, oggi definito "Funzionamento intellettivo minimo" il quale non è propriamente un RM nella vera accezione della parola, poiché il soggetto con "Funzionamento intellettivo minimo" ha un QI che tende ad avvicinarsi alla norma.

Accanto al parametro del livello intellettivo, l'altro aspetto clinicamente significativo riguarda l'assetto della personalità. L'ICD-10 ha differenziato diverse forme, in rapporto alla presenza o meno di disturbi comportamentali, degne di attenzione o di trattamento. Vi sono forme di RM in cui il quadro è dominato dal disturbo cognitivo mentre il comportamento e la relazione interpersonale sono adeguati al livello mentale (ritardo armonico). In altre forme, la struttura della personalità è compromessa, al di là del difetto cognitivo, con forti componenti nevrotiche o psicotiche (ritardo disarmonico)[8].

Quattro possono essere le patologie associate al RM: disadattamento con iperattività, disturbi dell'umore (atteggiamenti depressivi, maniacali o bipolari), disturbi della sfera motoria, disturbi generalizzati dello sviluppo.

1.2 Fattori etiopatogenetici

Il RM può essere considerato come un sintomo le cui cause più importanti sono estremamente eterogenee e nella maggior parte dei casi restano sconosciute. Secondo i dati dell'AAMR le cause del RM sono ancora sconosciute in circa il 30 % dei ritardi gravi e nel 50% di quelli lievi. I principali fattori etiopatogenetici includono:

- *cause genetiche* (circa il 30-40%): errori congeniti del metabolismo trasmessi soprattutto per via autosomica recessiva (per es., malattia di Tay-Sachs), altre anomalie di un singolo gene a trasmissione mendeliana e ad espressività variabile (per es. sclerosi tuberosa), aberrazioni cromosomiche (sindrome di Down dovuta a traslocazione, sindrome dell'X fragile);
- *cause prenatali, perinatali, postnatali* (circa il 10%): danni prenatali dovuti a sostanze tossiche (per es., uso di alcool da parte della madre,

infezioni), malnutrizione del feto, prematurità, ipossia, infezioni virali o altre infezioni, e traumi;

- *condizioni mediche generali acquisite durante l'infanzia o la fanciullezza* (circa il 5%): infezioni, traumi, e avvelenamenti;
- *influenze ambientali e altri disturbi mentali* (circa il 15-20%): mancanza di accudimento e di stimolazioni sociali, verbali o di altre stimolazioni, e disturbi mentali gravi (per es., Disturbo Autistico) [10].

1.3 Ritardo mentale legato al cromosoma X

Il RM X-linked (XLMR) rappresenta il 5-12 % dei casi di RM. Si suppone che i geni che influenzano le funzioni cognitive siano ubiquitari nel genoma umano. Fino ad oggi, la maggior parte di questi geni sono stati trovati sul cromosoma X (Fig. 1.1) per cui alterazioni di questo cromosoma sono considerate tra le più frequenti cause genetiche di RM [11].

Gli studi numerosi degli ultimi anni hanno portato all'individuazione di molti geni coinvolti e delle loro funzioni e la lista sembra ancora destinata a crescere (Fig. 1.2) [12].

L'ipotesi che alcuni casi di RM siano legati al cromosoma X è stata confermata da due osservazioni: la prima è la maggior frequenza del RM nel sesso maschile che supera del 30 % quella femminile; la seconda è la descrizione di numerose famiglie in cui vi è un modello di trasmissione ereditaria X-linked con maschi prevalentemente affetti, donne portatrici sane o affette meno severamente degli uomini, l'assenza di trasmissione da uomo a uomo [13]. Anche se i geni che causano il RM sembrano essere distribuiti lungo l'intera lunghezza del cromosoma X, in realtà le mutazioni che danno XLMR sono raggruppate in specifiche regioni. In particolare, vi è una alta concentrazione nella porzione distale del braccio lungo (Xq28), dove sono stati identificati quattro geni: FMR2, GDI1, MECP2, SLC6A8. Un altro pic-

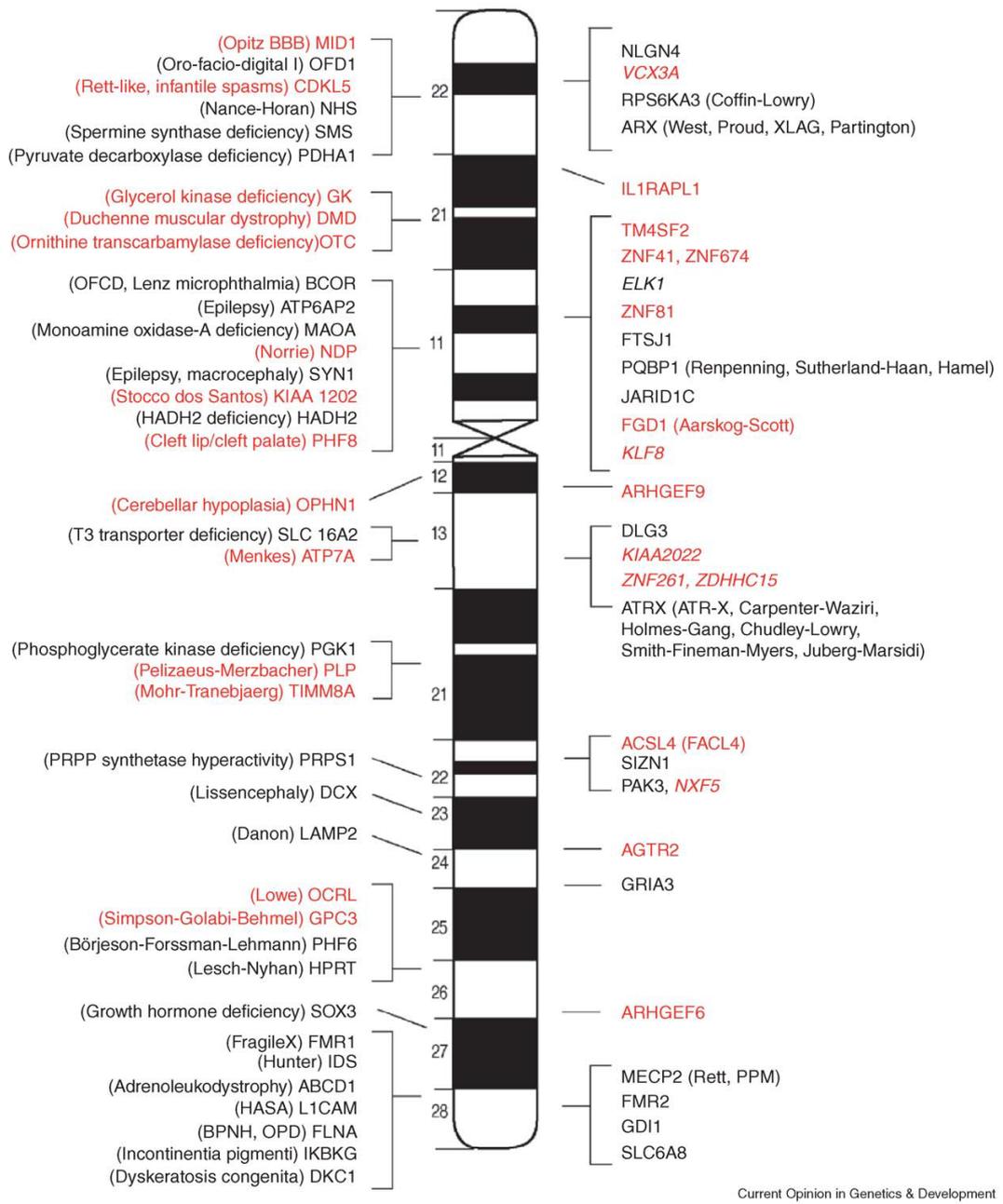


Figura 1.1: *Disegno schematico del cromosoma X. I geni e le sindromi associate responsabili del XLMR sindromico sono riportati a sx, i geni coinvolti nell'XLMR non sindromico a dx. I geni sono stati identificati tramite screening delle mutazioni o con lo studio dei riarrangiamenti cromosomici (in rosso). Tratto da Ropers 2006 [12].*

Gene	Funzione	
FMR2/FRAXE	Fattore di trascrizione; possibile ruolo nella memoria a lungo termine	1996
OPHN1	RhoGAP per RhoA, Rac1,cdc42; regolazione del citoscheletro	1998
GDI1	Inibitore della dissociazione del GDP per le proteine Rab4 e Rab5;possibile ruolo nell'endocitosi	1998
PAK3	Effettore di Rho GTPasi; regolazione del citoscheletro	1998
IL1RAPL1	Regolatore dell'esocitosi dei granuli densi del core; modulatore del rilascio del neurotrasmettitore	1999
RPS6KA3	Proteina serina-treonina chinasi;ruolo nella formazione della memoria a lungo termine	1999
MECP2	Proteina che si lega a CpG metilati	1999
ARHGEF6	Effettore di Rho GTPasi; regolazione del citoscheletro e stimolazione della crescita neuronale	2000
TM4SF2	Proteina di membrana che interagisce con integrina; possibile ruolo nella formazione delle sinapsi	2000
SLC6A68	Trasportatore di creatina; richiesto per il mantenimento della conc di (fosfo)creatina cerebrale	2001
ARX	Fattore di trascrizione con possibile ruolo nel mantenimento dei tipi specifici dei neuroni nella corteccia cerebrale; proliferazione neuronale; differenziazione dei neuroni GABAergici	2002
ATRX	DNA elicasi; coinvolta nel rimodellamento della cromatina; metilazione del DNA e regolazione della espressione genica	2002
FDG1	RhoGEF; possibile ruolo nella stimolazione della crescita neuronale	2002
ACSL4	Sintesi degli ac.grassi a catena lunga; possibile ruolo nella sintesi delle membrane	2002
AGTR2	Recettore per l'Angiotensina 2 espresso nel cervello	2002
PQBP1	Proteina legante poliglutamina; possibile ruolo nella trascrizione e mRNA splicing	2003
ZNF41	Proteina zinc-finger; regolatore trascrizionale; possibile coinvolgimento nel rimodellamento della cromatina	2003
NLGN4	Proteina della membrana postsinaptica che interagisce con la subunità NR2 del recettore NMDA	2004
FTSJ1	RNA metiltransferasi; possibile ruolo nella modificazione e traslazione del tRNA	2004
DLG3	Proteina di membrana guanilato-chinasi che interagisce con la subunità NR2 del recettore NMDA	2004
JARID1C	Ruolo nel rimodellamento della cromatina	2004
ZNF81	Proteina zinc-finger; correlata con ZNF41 e ZNF674	2004
GRIA3	AMPA recettore GLUR3; trasmissione sinaptica nel snc	2005
ARHGEF9	Importante ruolo nella formazione della glicina postsinaptica e dei recettori GABA(A)	2005
ZNF674	Proteina zinc-finger; correlata con ZNF41 e ZNF81	2006

Figura 1.2: Geni mutati in XLMR non sindromico e loro funzioni; in rosso geni mutati anche in XLMR sindromico. Tratto da Ropers 2006 [12].

co è localizzato nella regione Xp22.1-p21.3, distale al gene per la distrofia muscolare di Duchenne, ed include i geni ARX e IL1RAPL1 [14].

1.4 XLMR sindromico e non sindromico

Il XLMR veniva solitamente suddiviso in due categorie: XLMR sindromico (S-XLMR) se il RM era associato alla presenza di caratteri clinici somatici, neurologici, psicologici o metabolici e XLMR non sindromico o non specifico (NS-XLMR) se il solo sintomo presente era il RM. I termini "non specifico" o "non sindromico" furono utilizzati per la prima volta da Kerr et al. nel 1991[15]; da allora, sono stati riportati circa 140 casi di S-XLMR (in più della metà di questi sono stati identificati anche i geni coinvolti) e 82 famiglie con NS-XLMR in cui sono state trovate 24 mutazioni. L'ipotesi iniziale secondo la quale la distinzione fenotipica tra S-XLMR e NS-XLMR derivasse dal fatto che i geni responsabili del NS-XLMR fossero coinvolti in funzioni cerebrali specifiche, mentre i geni responsabili del S-XLMR codificassero per proteine con funzioni più generali oggi appare soltanto una semplificazione. Infatti la maggior parte dei geni del S-XLMR che del NS-XLMR sono espressi in un'ampia gamma di tessuti oltre al tessuto nervoso [16]. La dimostrazione, negli ultimi anni, che la differenza tra S-XLMR e NS-XLMR sia un pò arbitraria è stata possibile in seguito al riscontro di forme inizialmente ritenute non sindromiche in cui poi si identificano dei caratteri tipici e di forme sindromiche in cui si riscontra solo la presenza del RM. Inoltre mutazioni negli stessi geni sono state identificate sia nei pazienti con S-XLMR che con NS-XLMR. Un esempio classico è la sindrome dell'X fragile descritta per la prima volta nel 1943 da Martin e Bell in una famiglia di cui affermarono che: "nessuno degli affetti aveva caratteristiche peculiari, sia mentali che fisiche che potessero aiutare nella diagnosi..." [3]. La famiglia fu ristudiata nel 1981 da Richards che descrisse la presenza in tutti i maschi affetti di macroorchidismo, prognatismo e orecchie grandi, alta statura e classificò questa sindrome come appartenente al S-XLMR [17]. Un altro esempio più recente è quello

del gene OPHN1, inizialmente considerato come un gene del NS-XLMR, ma successivamente il riscontro di ipoplasia cerebellare, ventricolomegalia, strabismo e ipogenitalismo nei pazienti con mutazioni del OPHN1 portarono a considerarlo come un gene del S-XLMR [18]. D'altra parte, la presenza di una eterogeneità mutazionale è responsabile di quadri fenotipici differenti per cui geni che notoriamente sono responsabili di sindromi associate a forme molto gravi di RM, possono causare solo un RM lieve come nel caso del gene RSK2, responsabile della sindrome di Coffin Lowry ma che nei pazienti affetti da NS-XLMR mantiene ancora un 20% di attività.

1.5 Principali sindromi legate al XLMR

Nella seguente trattazione presenteremo le più comuni sindromi associate al RM le cui caratteristiche sono schematizzate nella figura 1.3. Di ognuna andremo ad analizzare in particolare i geni coinvolti e le loro funzioni e ci soffermeremo nella descrizione del quadro clinico (Fig. 1.3).

1.5.1 Sindrome dell'X fragile

La sindrome dell'X fragile è la causa più comune di RM dopo la sindrome di Down e la più frequente fra quelle ereditarie. Colpisce circa 1: 4000 maschi e 1:6000 femmine, i portatori sani sono tra 1:150 e 1:400 nelle diverse popolazioni. La malattia è causata da una mutazione del **gene FMR1** (Fragile Mental Retardation 1), situato nel cromosoma X e individuato nel 1991. Questa alterazione nella maggior parte dei casi porta all'assenza o alla carenza della proteina, FMRP, codificata da questo gene. La funzione di FMRP non è ancora nota con certezza, ma sembra essere implicata nello sviluppo dendritico e nei processi neuronali che stanno alla base dell'apprendimento e della memoria. Il nome *X fragile* deriva dal fatto che l'alterazione del gene FMR1 provoca delle modificazioni nella struttura del cromosoma X che al microscopio presenta una strozzatura in un punto preciso (quello in cui è situato il gene). Nella maggior parte dei casi di sindrome dell'X fragile, l'alter-

Gene	Sindrome	Caratteristiche principali
FMR1	<i>Sindrome dell' X-fragile</i>	Dismorfismo della facies, macroorchidismo
MECP2	<i>Sindrome di Rett</i>	Regressione, epilessia, microcefalia acquisita, stereotipie delle mani, autismo
	<i>Encefalopatia neonatale fatale nei maschi</i>	Ipotonia, apnea, epilessia
	<i>Spasticità progressiva</i>	Spasticità
	<i>Sindrome Angelman e Prader-Will simile</i>	
XNP	<i>ATR-X</i>	Microcefalia, ipotonia facciale, dismorfismo della facies, urogenitali, scheletriche, α -talassemia, inclusioni HbH.
	<i>Sindrome di Juberg-Marsidl</i>	
	<i>Sindrome di Carpenter</i>	
	<i>Sindrome di Halmes-Gang</i>	
	<i>Sindrome di Smith-Fineman-Myers</i>	
	<i>Sindrome di Chudley-Lowry</i>	
	<i>Paraplegia spastica</i>	Microcefalia, bassa statura, diplegia spastica
RPS6KA3	<i>Sindrome di Coffin-Lowry</i>	Dismorfismo della facies e scheletriche
ARX	<i>Sindrome di West</i>	Spasmi infantili, regressione
	<i>Sindrome di Partington</i>	Epilessia, distonia
	<i>Lissencefalia X-linked, genitali ambigui</i>	Lissencefalia, agenesia del corpo calloso, epilessia, genitali ambigui
	<i>Sindrome di Proud</i>	Microcefalia, agenesia del corpo calloso, anomalie urogenitali
OPHN1	<i>Sindrome da mutazione del gene OPHN1</i>	Ipoplasia cerebellare, epilessia
SLC16A2 (MCT8)	<i>Sindrome di Allan-Herndon-Dudleys</i>	Ipotonia, spasticità, distonia, aumento di T3 nel sangue
PQBP1	<i>Sindrome di Renpenning,</i>	Microcefalia, bassa statura, faccia allungata, cardiopatiee congenite, palatoschisi.
	<i>Sindrome di Sutherland-Haan,</i>	
	<i>Sindrome cerebropalatocardiaca di Hamel</i>	
	<i>Sindrome di Golabi-Ito-Hall</i>	
FGD1	<i>Sindrome di Aarskog-Scott</i>	Dismorfismo della facies, anomalie digitali e dei genitali, bassa statura
JARIDIC	<i>Sindrome da mutazione del gene JARID1C</i>	Mirocefalia, spasticità, epilessia, bassa statura, dismorfismo della facies
SLC6A8	<i>Sindrome da deficit di creatina</i>	Epilessia, ritardo del linguaggio, disturbi del comportamento, ipotonia

Figura 1.3: *Principali sindromi legate al XLMR e loro caratteristiche. Tratto da Ropers 2005 [19].*

azione responsabile della sindrome è l'espansione, attraverso le generazioni, di un tratto di DNA del gene FMR1 (sito fragile FRAXA) composto da tre basi nucleotidiche ripetute (CGG). Nella popolazione normale il numero delle triplette può variare da 6 a 50; nei soggetti con la mutazione il numero delle triplette è maggiore e tende ad aumentare nella trasmissione da una generazione all'altra. In base al numero delle triplette CGG si distinguono due tipi di mutazioni:

- **premutazione:** il numero CGG varia da 55 a 200. Sia le femmine che i maschi possono essere portatori della premutazione e non manifestare alcuna sintomatologia clinica. La premutazione trasmessa per via materna tende ad espandersi, per cui le femmine con premutazione hanno il 50% di rischio di avere figli affetti. Al contrario le dimensioni dell'amplificazione rimangono generalmente stabili se la premutazione viene trasmessa per via paterna.
- **mutazione completa:** il numero delle triplette CGG è superiore a 200 con conseguente metilazione del promotore, blocco della trascrizione del gene ed assenza della proteina (FMRP). La mutazione completa è presente in tutti i soggetti affetti, maschi e femmine; tra le femmine circa il 50% presenta RM e tratti fenotipici della sindrome dell' X fragile.

Attualmente non è chiaro il confine tra il limite superiore del genotipo normale ed il limite inferiore del genotipo premutato. Per questa ragione la comunità scientifica ha convenzionalmente definito una cosiddetta zona grigia di premutazione (**gray zone**), nella quale ha raggruppato gli alleli costituiti da un numero di ripetizioni della tripletta nucleotidica che varia da 45 a 60. Infatti, alcuni di questi alleli sono instabili e tendono ad espandere da generazione in generazione; altri sono stabili e non tendono ad espandersi nelle successive generazioni.

Di recente è stato identificato un nuovo sito fragile FRAXE (gene FMR2) situato poco distante da FRAXA, anch'esso caratterizzato dalla possibile espansione della tripletta GCC. I soggetti normali, in questo gene, presentano

da 6 a 25 ripetizioni della tripletta GCC, mentre i soggetti con più di 200 ripetizioni, come per il gene FMR1, manifestano il RM. Lo stato di premutazione è caratterizzato dalla presenza di un numero di triplette che varia da 50 a 200. Ricorrendo al test del DNA è oggi possibile individuare sia la premutazione sia la mutazione completa, attraverso indagini di genetica molecolare che permettono un'identificazione accurata dei soggetti affetti e dei portatori.

Quadro clinico

Tipicamente il paziente adulto affetto da sindrome dell'X fragile presenta tratti somatici tipici: altezza elevata e macrocrania, viso stretto e allungato con fronte e mandibola prominenti, orecchie più grandi e più basse della media, macroorchidismo unilaterale o bilaterale. Nel 20% delle femmine portatrici di una premutazione, la menopausa precoce rappresenta una conseguenza di un'insufficienza ovarica. I soggetti affetti da sindrome dell'X fragile possono presentare anche altri sintomi: ipotonia muscolare congenita accompagnata da iperestensibilità delle articolazioni, piede piatto, strabismo e prolasso della valvola mitrale. Il primo segno della malattia è il ritardo nello sviluppo psicomotorio con ritardo nell'apprendimento del linguaggio. Il RM è di grado variabile (QI tra 20 e 70) e con l'avanzare dell'età tende a peggiorare. A volte possono manifestarsi anche episodi convulsivi durante l'infanzia con caratteristici pattern all' EEG. La Risonanza magnetica nucleare (RMN) cerebrale mostra nel complesso un volume conservato, una diminuzione del rapporto tra sostanza grigia e sostanza bianca, un nucleo caudato un ippocampo ingranditi, un verme cerebellare lievemente ridotto con un aumento di volume del quarto ventricolo. Studi di neuropatologia hanno dimostrato la presenza di spine dendritiche più lunghe con una morfologia immatura sia nell'area temporale che occipitale. Il comportamento dei soggetti affetti da sindrome dell'X fragile può andare da un carattere estroverso, socievole, iperattivo ad instabilità psicomotoria e attentiva sino a comportamenti simil autistici [20].

1.5.2 Sindrome di Rett

La sindrome di Rett (SR) è una delle cause di RM più diffusa nelle femmine, caratterizzata da una disfunzione grave e globale dello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC). La malattia è causata dalla mutazione del **gene MECP2** (methyl-CpG-binding protein 2) nella maggior parte dei casi, ma nelle forme atipiche può essere determinata da una mutazione del **gene CDKL5** (cyclin dependent kinase-like 5). Il tipo di relazione tra MECP2 e CDKL5, e se causano la SR attraverso lo stesso meccanismo non è ancora chiaro. Il gene MECP2 può codificare per una proteina di 498 aminoacidi (MECP2B) presente soprattutto nel cervello e per una proteina di 486 aminoacidi (MECP2A) predominante in altri tessuti come nelle cellule linfoblastiche e fibroblastiche. La proteina MECP2 ha un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica; è costituita da tre domini funzionali: MBD (methyl-CpG binding domain) che si lega al DNA metilato, TRD (transcriptional repression domain) che possiede siti di legame per i complessi co-repressori che mediano la repressione attraverso la deacetilazione del core degli istoni, con conseguente compattazione del DNA in eterocromatina. MECP2 interagisce con altri complessi repressori che hanno la stessa funzione: Sin3A/HDACI o Ski/NcoR/HDACII. Il terzo dominio, NLS (nuclear localisation signal), localizzato nella porzione C-terminale della proteina, è in grado di facilitare il legame con il DNA anche se il suo ruolo non è stato ancora ben stabilito [21].

Quadro clinico

La SR è caratterizzata da un profilo di sviluppo specifico e recentemente sono stati stabiliti dei criteri diagnostici da utilizzare come linee guida per la diagnosi di questa sindrome. Per la forma classica della SR, i **criteri diagnostici** includono un normale periodo prenatale e perinatale con sviluppo psicomotorio regolare per i primi 5-6 mesi di vita. Alla nascita la circonferenza cranica è normale, ma dopo il primo anno di vita, si osserva un rallentamento della crescita che porta allo sviluppo di microcefalia per la

presenza di atrofia cerebrale diffusa grave in particolare della sostanza grigia. Tra il terzo mese e il terzo anno si assiste ad una riduzione o perdita delle abilità acquisite, ritardo del linguaggio e severo ritardo psicomotorio. Contraddistinguono la SR la comparsa di stereotipie delle mani (hand washing) e andatura atassica tra 1 e 4 anni. I **criteri di supporto** comprendono disturbi respiratori (apnee notturne, iperventilazione), anomalie dell'EEG ed epilessia, spasticità spesso associata ad atrofia muscolare e distonia, disturbi vasomotori periferici, scoliosi e ritardo di crescita, ipotrofia, piedi piccoli, bruxismo, brevità del IV osso metacarpale e/o metatarsale. Sono stati stabiliti anche dei **criteri di esclusione** quali ridotta crescita intrauterina, visceromegalia e alterazioni dei depositi, retinopatia, cataratta, atrofia ottica, microcefalia alla nascita, storia di lesioni cerebrali perinatali o postnatali, disordini del metabolismo identificabili alla nascita o patologie neurodegenerative, malattie neurologiche acquisite in seguito ad infezioni o trauma cranici [22].

La storia naturale della SR può evolvere in quattro stadi (Fig. 1.4):

- *I stadio*: tra 6 e 18 mesi, pur non essendoci dei segni particolarmente evidenti di SR, si può dimostrare un ritardo nel mantenimento del capo, una stasi dello sviluppo, una riduzione dell'interesse per il gioco, ipotonia, una lenta crescita della circonferenza cranica.
- *II stadio*: tra 1 e 3 anni, si ha una rapida regressione del comportamento, perdita delle abilità manuali, crisi convulsive, stereotipie delle mani, autismo, regressione del linguaggio, movimenti goffi, insonnia, comportamenti di auto-mutilazione.
- *III stadio*: tra 2 e 10 anni si ha una relativa stabilizzazione con sviluppo di RM severo, aggravamento dei tratti autistici, spasticità, aprassia, atassia, disturbi della respirazione.
- *IV stadio*: comprende il periodo dopo i 10 anni ed è caratterizzato dalla perdita delle funzioni motorie con scoliosi, rigidità, atrofia muscolare

che costringono il bambino alla sedia a rotelle, comparsa di sintomi piramidali ed extra-piramidali, ritardo di crescita, assenza del linguaggio e mancanza del contatto oculare [21].

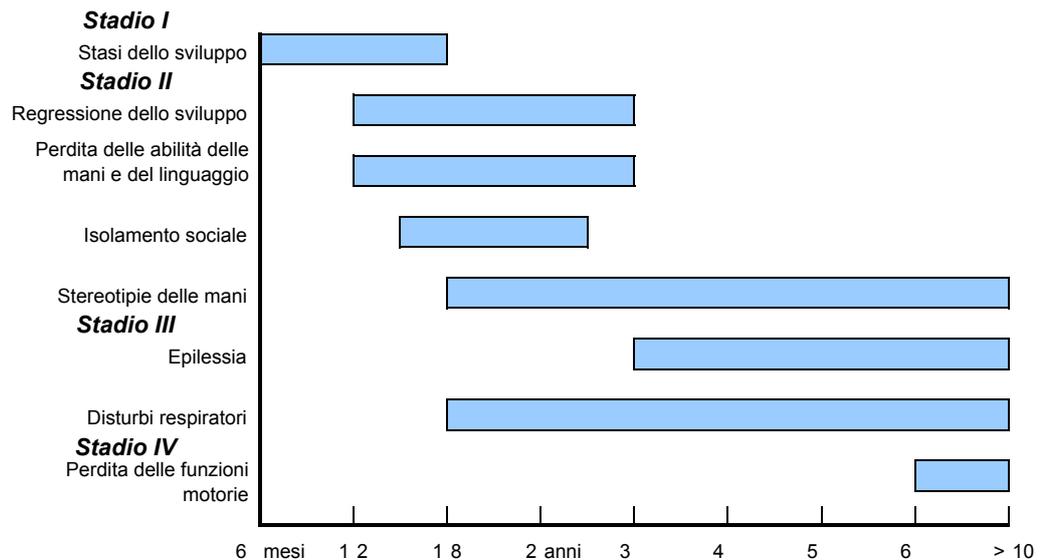


Figura 1.4: Schema dei quattro stadi in cui viene solitamente suddiviso il decorso della forma classica della SR. Tratto da Weaving 2005 [21].

Gli stadi precedentemente descritti corrispondono alla più comune espressione clinica di questa sindrome, ma sono state descritte numerose varianti che possono essere più o meno gravi della forma classica. La diagnosi di queste forme in passato era fatta con molta cautela, ma oggi si può avere la conferma con la ricerca delle mutazioni in MECP2.

Mentre in passato si riteneva che la SR fosse esclusivamente presente nel sesso femminile e che nei maschi fosse letale, negli ultimi anni sono stati riportati casi in letteratura che dimostrano la presenza di mutazioni genetiche di MECP2 anche nei maschi. La precedente convinzione che la SR fosse una patologia esclusivamente femminile era basata su studi che avevano dimostrato come le mutazioni in MECP2 fossero legate alla spermatogenesi e

poichè il padre trasmette il suo cromosoma X soltanto alle figlie femmine, i maschi non potevano essere affetti da tale sindrome. Attualmente sono stati descritti circa 60 pazienti maschi con mutazioni in MECP2 e la maggior parte di loro sono stati identificati perchè hanno una sorella affetta da una forma classica di SR; in questi casi la mutazione è trasmessa dalla madre [23] [24]. Mutazioni in MECP2 nei maschi possono determinare sindromi con uno spettro clinico diverso: encefalopatia neonatale, sindrome di Angelman, sindrome di Rett, RM severo con o senza spasticità progressiva, sindrome PPM-X (mental retardation, psychosis, pyramidal signs e macroorchidism) [25].

1.5.3 Alfa talassemia e ritardo mentale X-linked

Mutazioni del **gene ATRX** determinano una sintesi alterata della proteina XNP, una DNA-elicasi ATP-dipendente che si associa con l'eterocromatina dei centromeri e del braccio corto dei cromosomi ed interagisce con altre proteine quali HP1 e Daxx. L'XNP sembra avere un ruolo fondamentale nel rimodellamento della cromatina, nella metilazione del DNA e nella regolazione dell'espressione genica [16].

Quadro clinico

Tratti dismorfici della facies sono riconoscibili dalla prima infanzia. L'attaccatura frontale dei capelli è irregolare, il naso è piccolo e rivolto verso l'alto con una radice piatta. Il labbro superiore è "a tenda", quello inferiore è grosso e rovesciato e vi è ipotonia facciale. Gli incisivi anteriori sono molto distanziati, la lingua protrude dalla bocca ed è presente scialorrea. Le orecchie sono normali poste leggermente più in basso. Nell'80% dei bambini affetti sono presenti malformazioni dell'apparato genitale: criptorchidismo, genitali esterni femminili ambigui con assenza delle strutture di Muller e presenza nell'addome di testicoli disgenetici e gonadi atrofiche. Lo sviluppo puberale è spesso ritardato o arrestato. Sono state descritte anomalie delle dita: clinodattilia, sindattilia cutanea, brachidattilia, dita affusolate, falangi

a "bacchetta di tamburo", dita accavallate e un singolo caso di pollice bifido, inoltre sono stati descritti, anche se in pochi casi, cifosi e/o scoliosi, deformità del torace, spina bifida e altre anomalie delle vertebre. La statura è bassa in alcuni casi sin dalla nascita, in altri vi è un ritardo di crescita nel periodo dello scatto puberale. Sono molto frequenti le anomalie gastro-enteriche: ulcera peptica, esofagiti, emorragie gastrointestinali superiori, vomito e reflusso gastroesofageo. L'aspirazione del materiale refluito è spesso causa di morte in questi pazienti e il dolore causato dall'ulcera peptica può essere una possibile spiegazione degli episodi di pianto persistente e di rifiuto del cibo che si ha in questi pazienti. Sono state descritte anche molte anomalie cardiache: difetto del setto, pervietà del dotto arterioso, stenosi della polmonare, stenosi dell'aorta, tetralogia di Fallot e un singolo caso di trasposizione dei grossi vasi. Anomalie renali possono manifestarsi con infezioni delle vie urinarie ricorrenti e possono essere: idronefrosi, ipoplasia o agenesia renale, rene policistico, reflusso vescico-uretrale [26].

La presenza dell' α -talassemia fu inizialmente uno degli elementi determinanti per far diagnosi di questa sindrome, ma la relazione tra le mutazioni dell'ATR-X e l' α -talassemia non sono chiare. In passato la diagnosi certa era data dalla presenza di un eccesso di catene β (inclusioni HbH) ma queste possono non comparire finchè non vi è una riduzione del 30-40% della sintesi delle catene α . Inoltre sono state identificate un numero di famiglie in cui alcuni o tutti i membri affetti non presentano le inclusioni HbH [27]. Confrontando 32 casi di 26 generazioni diverse con una identica mutazione si evidenzia una variazione nella frequenza di inclusioni HbH tra 0 e 14%. Il fatto che pazienti con una identica mutazione possano avere differenti gradi di α -talassemia suggerisce che l'effetto della proteina ATR-X sull'espressione genetica possa essere modificato da altri fattori genetici [28]. L'anemia comunque è lieve e non richiede trattamento.

Nella maggior parte dei casi è presente un RM severo accompagnato da un linguaggio espressivo molto limitato e la presenza di ipotonia determina anche un ritardo nell'acquisizione della deambulazione autonoma. Con il pas-

sare del tempo gli individui affetti sviluppano una tendenza alla spasticità. In 1/3 dei casi sono presenti crisi epilettiche soprattutto di tipo tonico-cloniche o miocloniche. La valutazione delle funzioni visive e uditive è spesso difficile da eseguire; la visione appare generalmente normale anche se sono stati riportati due casi di bambini ciechi. La circonferenza cranica è normale alla nascita, ma successivamente si ha microcefalia. La RMN e la Tomografia Computerizzata (TC) cerebrali non rivelano particolari alterazioni tranne la presenza di una lieve atrofia generalizzata e il riscontro soltanto in due casi di una parziale o completa agenesia del corpo calloso. I pazienti sono in genere descritti dai loro parenti come giosi, felici e hanno un comportamento adeguato alle circostanze anche se in alcuni casi possono avere crisi di gioia o di pianto incontrollati; quest'ultimi spesso associati alla comparsa di dolori gastrointestinali. Sono state descritte fluttuazioni dell'umore con improvvisi passaggi da agitazione ed eccitazione a depressione e isolamento. Mentre molti pazienti si affezionano alle persone che gli stanno accanto e accettano il contatto fisico, altri mostrano un comportamento simil autistico. Possono presentare comportamenti irrequieti, movimenti simil coreoatetoidi, movimenti stereotipati, frequentemente portano le loro mani alla bocca inducendo il vomito, possono assumere comportamenti autolesivi stringendosi le mani attorno al collo fino alla cianosi. Molte altre sindromi caratterizzate dall'associazione del RM con aspetti dismorfici caratteristici sono causati da mutazioni del gene ATRX: XLMR con paraplegia spastica, Sindrome di Juberg-Marsidi, Sindrome di Carpenter-Waziri, Sindrome di Holmes-Gang, Sindrome di Smith-Fineman-Myers, Sindrome di Chudley-Lowrt [29].

Una singola famiglia è stata riportata con NS-XLMR nella quale erano assenti i tratti dismorfici caratteristici e il profondo deficit intellettuale della sindrome ATRX, presenti invece in altri membri della stessa famiglia dimostrando l'esistenza di variazioni intrafamiliari delle mutazioni di questo gene [30].

1.5.4 Sindrome di Coffin-Lowry

Mutazioni del **gene RPS6KA3** (ribosomal protein S6 Kinase, 90KDa polipeptide 3), precedentemente conosciuto come RSK2, sono responsabili della sindrome di Coffin-Lowry (CLS). L'RSK2 ha un ruolo fondamentale nel controllo dell'espressione genica ed è implicata in molti eventi cellulari quali la proliferazione e la differenziazione, la risposta cellulare allo stress, l'apoptosi. Sono stati identificati numerosi substrati del RSK2 tra i quali c-Fos, c-Jun e cAMP responsive element binding protein (CREB) che ha un ruolo importante nell'apprendimento e nella memoria a lungo termine ed è coinvolto nella acetilazione dell'istone H3. Recentemente è stato dimostrato che le anomalie scheletriche presenti nella CLS sono dovute ad un'alterata fosforilazione da parte dell' RSK2 di un fattore di trascrizione, ATR4, che ha un ruolo chiave nella differenziazione degli osteoblasti [31].

Quadro clinico

Gli indici di crescita alla nascita rientrano nei limiti della norma anche se la fronte alta e larga può dare una falsa impressione di macrocefalia. Successivamente, invece, un ritardo nell'accrescimento porta in età giovanile a una bassa statura con valori medi di altezza di 143 cm (115-158cm), spesso aggravata da una severa scoliosi. Le caratteristiche del volto sono tipiche, specie nei maschi, tanto da permettere una diagnosi rapida. La prominenza delle arcate sopraorbitali è presente sin dalla prima infanzia insieme a ipertelorismo e rime palpebrali ristrette e inclinate verso il basso. Caratteristico è l'aspetto del naso con radice larga, narici antiverse, ali nasali e setto nasale ispessito. Le labbra sono grosse e prominenti con labbro inferiore rovesciato, i denti sono spesso malposizionati con conseguente maleocclusione, microdonzia, prognatismo, palato ogivale. Le orecchie sono larghe e sporgenti. Questi tipici aspetti del volto diventano ben evidenti dal secondo anno di vita e subiscono un progressivo peggioramento con incremento della prominenza della glabella e protrusione delle labbra. Le anomalie degli arti sono minori ma molto caratteristiche: gli avambracci sono ispessiti per aumento del

tessuto adiposo sottocutaneo, le mani sono larghe, la piega orizzontale nella regione dell'ipotenar è corta, le dita sono larghe alla base e affusolate distalmente. Approssimativamente l'80% dei maschi affetti hanno un petto carenato o escavato; il progressivo sviluppo di cifosi o scoliosi può portare a compromissioni cardiorespiratorie. Altre caratteristiche riportate sono: ernia inguinale nei maschi e obesità generalizzata nelle donne, insufficienza mitralica e cardiomiopatia dilatativa secondaria. All'esame radiologico si osservano alterazioni del cranio, della colonna vertebrale e delle mani. Il cranio appare ispessito in corrispondenza dell'osso frontale con variabile allargamento o ipoplasia del seno frontale; la fontanella anteriore è dilatata e vi è ritardo nella chiusura. A livello toraco-lombare le vertebre possono determinare un restringimento dello spazio intervertebrale e incuneamenti anteriori. Le anomalie vertebrali, la lassità delle strutture ligamentose e l'ipotonia predispongono allo sviluppo della scoliosi. La radiografia delle mani dimostra la presenza di falangi distali corte con estremità a "bacchetta di tamburo"; una pseudoepifisi potrebbe essere presente alla base del metacarpo. Il RM è severo nei maschi mentre nelle donne si può avere un quadro variabile da un RM severo fino a capacità intellettive relativamente normali. E' particolarmente comune un ritardo nell'acquisizione del linguaggio con un vocabolario molto limitato. Gli esami neuroimaging evidenziano nei maschi e nelle femmine severamente colpite la presenza di ventricolomegalia le cui cause però restano sconosciute. Altre manifestazioni di un coinvolgimento del SNC includono: ipotonia congenita generalizzata, convulsioni che compaiono attorno al primo anno di vita e perdita graduale dell'udito.

Sono stati descritti casi di donne affette da Sindrome di Coffin-Lowry che presentavano comportamenti psicotici episodici o per un periodo più prolungato, schizofrenia o psicosi depressiva. Questi comportamenti sono descritti raramente nei maschi affetti che sono di solito gioiosi, allegri, socievoli [32].

Una singola famiglia con NS-XLMR e mutazione in questo gene è stata riportata [33], ma recentemente le mutazioni sono state descritte in altre tre famiglie che non presentano i criteri diagnostici della CLS. Questo suggerisce

che mutazioni del gene RPS6KA3 possono essere causa di XLMR più spesso di quanto si crede ed andrebbero ricercate quando sono presenti solo alcune delle caratteristiche della CLS. Un deficit parziale della proteina può essere la causa di un NS-XLMR [33].

1.5.5 Sindrome da mutazione del gene ARX

Mutazioni del **gene ARX** (Aristaless related homeobox gene) possono causare diverse sindromi associate al RM: Epilessia mioclonica e spasticità, Sindrome con spasmi infantili X-linked (ISSX) o sindrome di West recessiva X-linked, sindrome di Partington, Lissencefalia X-linked e anomalie dei genitali (XLAG), NS-XLMR [34]. Il gene ARX codifica per un'ampia famiglia di proteine che sembrano essere coinvolte nella proliferazione neuronale e nella differenziazione dei neuroni GABAergici [18]. Il gene ARX è espresso nella corteccia cerebrale, amigdala, corpo calloso, nucleo caudato e ippocampo; aree coinvolte nella fisiopatologia delle crisi epilettiche, nei disturbi neuropsichiatrici, nei movimenti involontari, nell'apprendimento e nella memoria [35].

Quadro clinico

In questi pazienti sono stati descritti dei caratteri dismorfici, ma non ci sono segni caratteristici presenti in tutti gli affetti. Tuttavia sono stati descritti in alcuni pazienti la presenza di un viso allungato, ipertelorismo, labbra sottili, grandi orecchie. Tutti i pazienti con mutazioni del gene ARX presentano un RM non progressivo e variabile da lieve nella mutazione più comune, 428-451dup, a severo. Il RM può essere isolato o associato a comportamenti autistici o ad altre manifestazioni neurologiche. Le crisi epilettiche possono essere di vario tipo; gli spasmi infantili sono associati con il ritardo mentale nel 70-90 % dei casi; la presenza di spasmi infantili, ipsaritmia all'EEG, arresto di sviluppo sono caratteristici della Sindrome di West. L'eziologia eterogenea degli spasmi infantili include vari disordini genetici tra

cui la sindrome di West X-linked recessiva o Sindrome degli spasmi infantili X-linked (ISSX) [35]. Gli altri tipi di crisi epilettiche presenti possono essere di tipo tonico-clonico generalizzate, miocloniche, assenze, atoniche. Possono presentare inoltre, ipotonia seguita da spasticità compatibile con un ritardo di mielinizzazione, atassia e distonia in particolare nella sindrome di Partington caratterizzata da crisi epilettiche, movimenti distonici delle mani, ritardo mentale. La circonferenza cranica può variare essendo stati descritti casi con microcefalia e macrocefalia. Gli esami di neuroimaging mostravano in alcuni pazienti la presenza di atrofia corticale, atrofia cerebellare e di cisti intracraniche [36].

In particolare la XLAG è una sindrome caratterizzata dalla lissencefalia X-linked, agenesia del corpo calloso, microcefalia, epilessia farmaco-resistente, disfunzioni ipotalamiche con ipotermia e genitali ambigui nei maschi. La RMN encefalo mostra una lissencefalia più grave nelle regioni posteriori, anomalie dei nuclei della base con frammentazione del nucleo caudato e assenza dello striato. Studi autoptici eseguiti su tre pazienti hanno dimostrato microcefalia con assenza dei bulbi olfattori, espansione del terzo ventricolo e del lobo temporale e displasia dell'ippocampo. Istologicamente la corteccia è organizzata in tre strati distinti invece dei normali cinque, con una completa riduzione degli interneuroni e presenza soltanto di cellule piramidali [34] [37].

1.5.6 Sindrome da mutazione del gene OPHN1

Il gene **OPHN1** (oligophrenin 1) codifica per una proteina RhoGAP che inattiva la Rho GTPasi. Queste GTPasi hanno un ruolo nella trasduzione di segnali extracellulari al citoscheletro di actina e da questo al nucleo. Sono importanti in particolare nel regolare la riorganizzazione del citoscheletro durante i processi di movimento e di crescita cellulare. L'inattivazione di OPHN1 incrementa l'attività delle Rho GTPasi e in particolare di RhoA, Rac e Cdc42 [18].

Quadro clinico

Questi pazienti presentano in genere una statura elevata e macrocefalia con dismorfismi facciali caratterizzati da fronte stretta, mento prominente, naso "a becco", occhi profondi e strabismo. Possono essere presenti anche malformazioni genitali come ipogenitalismo con criptorchidismo, scroto ipoplastico e pene piccolo. Si può osservare anche la presenza di ipotonia, ritardo di sviluppo psicomotorio con RM moderato-severo e ritardo nell'acquisizione del linguaggio. La RMN cerebrale di tutti i pazienti descritti mostra un certo grado di ipoplasia del verme cerebellare e dilatazione cistica della cisterna magna con displasia posteriore del tentorio. Nonostante la loro alterata morfologia cerebrale, non sempre sono stati descritti sintomi di disfunzione cerebellare quali atassia o disartria. Al di sopra del tentorio del cervelletto si rileva la presenza di ventricolomegalia non associata a displasia corticale. Nei casi più severi si sviluppa idrocefalo che richiede una derivazione liquorale ventricolo-peritoneale. Altri sintomi neurologici descritti in alcuni casi sono: epilessia, spasticità, movimenti abnormi degli occhi e oftalmoplegia [38].

Famiglie con mutazioni in OPHN1 furono inizialmente descritte come aventi un NS-XLMR, ma una successiva rivalutazione dei pazienti affetti dimostrò una significativa ipoplasia cerebellare per cui questa condizione è oggi considerata come una sindrome [38].

1.5.7 Sindrome di Allan-Herndon-Dudly

Questa sindrome è determinata da una mutazione del **gene SLC16A2** (solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporter), member 2), anche conosciuto come MCT8, la cui funzione essenziale sembra essere il trasporto di T_3 nei neuroni (gli ormoni tiroidei sono fondamentali per lo sviluppo del SNC nel primo anno di vita). Un'alterazione della funzione di trasporto è dimostrata dalla presenza di elevati valori di T_3 e ridotti valori di T_4 nel sangue dei maschi affetti. Ciò nonostante i pazienti non presentano altera-

zioni delle funzioni della tiroide; in particolare non mostrano segni o sintomi di ipotiroidismo o ipertiroidismo congeniti poichè T_3 è in grado di penetrare negli organi più importanti: cuore, ossa, intestino, fegato, per cui evidentemente in questi tessuti altri trasportatori possono contribuire ad un adeguato approvvigionamento di T_3 . I valori alterati di T_3 e T_4 possono essere un importante test di screening nei pazienti con ritardo mentale X-linked per far diagnosi della Sindrome di Allan-Herndon-Dudley [39].

Quadro clinico

Nei pazienti affetti da Sindrome di Allan-Herndon-Dudley non sono presenti segni dismorfici caratteristici, ma la configurazione del volto è in genere allungata con le orecchie normalmente conformate o a coppa. Non presentano malformazioni; la crescita intrauterina è ridotta ma alla nascita la circonferenza cranica e l'apparato genitale sono generalmente normali [41]. Lo sviluppo cognitivo è severamente compromesso e si accompagna ad un ritardo nelle tappe fondamentali dello sviluppo. Caratteristica è la presenza di una ipotonia generalizzata che si manifesta con scialorrea, difficoltà nel controllo del capo, incapacità di deambulare autonomamente o atassia se sono in grado di camminare. L'ipotonia si trasforma nell'adulto in spasticità. Le mani presentano distonia e atteggiamenti atetoidi, sono spesso chiuse a pugno, può essere presente nistagmo rotatorio e deficit uditivo e visivo [41].

1.5.8 Sindrome di Renpenning

Mutazioni in **PQBP1** (polyglutamine binding protein 1), gene coinvolto nello splicing del RNA, determinano la comparsa di questa sindrome, ma sono state riscontrate anche nelle sindromi di Sutherland-Hann, Hamel cerebropalatocardiac, Golabi-Ito-Hall e Porteous.

Quadro clinico

Il RM, microcefalia, bassa statura, testicoli piccoli, costituiscono la tetraide tipica dei pazienti con la Sindrome di Renpenning [42]. Oltre alla microcefalia il volto tende ad essere stretto e lungo, con le rime palpebrali rivolte verso l'alto, con orecchie a coppa, con un naso lungo o bulboso. Inoltre molti pazienti sono caratterizzati da un mascellare sottosviluppato e una mandibola prominente. Gli aspetti craniofacciali possono aiutare ma non sono così caratteristici da permettere di fare diagnosi nei casi isolati. Le malformazioni non sono comuni nella Sindrome di Renpenning ma sono stati descritti casi di malformazioni cardiache, atresia anale, situs inversus, schisi palatina, coloboma oculare. Pochi segni scheletrici e cutanei sono stati descritti; la maggior parte dei maschi affetti hanno bassa statura e in alcuni casi sono presenti piedi e mani esili, clinodattilia del V dito e petto scavato. La microcefalia può essere descritta sin dalla nascita ma agli esami di imaging cerebrali non sono evidenti malformazioni o altri caratteri rilevanti. Anche se rari si possono associare segni di spasticità, ipotonia, epilessia, deficit uditivo [42].

1.5.9 Sindrome di Aarskog-Sott

Mutazioni in **FGD1** (displasia facio-genitale tipo I) determinano la comparsa di questa sindrome. Il gene FGD1 codifica per una proteina del gruppo RhoGEF che attiva la Rho GTPasi Cdc42. Il complesso FGD1/Cdc42 è coinvolto nella riorganizzazione del citoscheletro durante i processi di movimento e di crescita cellulare.

Quadro clinico

La sindrome di Aarskog, o displasia facio-digito-genitale, è una rara malattia legata all'X, associata a facies caratteristica, aspetto peculiare delle dita e scroto "a scialle". I segni facciali comprendono attaccatura dei capelli a punta, ipertelorismo, naso rivolto all'in su e solchi curvilinei al di sotto del labbro inferiore ma questi segni tendono a diventare meno evidenti con l'età.

Le mani e i piedi sono piccoli e tozzi. Possono essere presenti pterigi interdigitali e clinodattilia. È caratteristica la deformità delle dita "a collo di cigno", dovuta alla iperestensione delle articolazioni interfalangee prossimali e alla flessione di quelle distali. Possono essere presenti altri segni clinici, compreso il criptorchidismo, le rime palpebrali oblique in basso e verso l'esterno, l'ipoplasia mascellare, le orecchie a coppa, la ptosi e l'edema agli arti nei bambini. Lo scroto a scialle nei bambini con bassa statura è tipico della sindrome di Aarskog, ma nel 20% dei casi non è presente. Questi casi vengono diagnosticati in base alla bassa statura o al RM. Inizialmente l'altezza è inferiore al terzo percentile, ma di solito il difetto viene recuperato durante la pubertà. Uno studio ha dimostrato un effetto positivo del trattamento con GH sulla crescita e sulla statura nell'età adulta. Lo sviluppo sessuale è normale, ma può essere ritardato; è riportata fertilità. Circa il 30% dei casi può presentare ritardo mentale, di solito lieve, con difficoltà nell'apprendimento e nel mantenimento dell'attenzione. L'integrazione sociale dei pazienti e la qualità della loro vita sono soddisfacenti [43].

1.5.10 Sindrome da mutazione del gene JARID1C

Mutazioni del gene SMCX (Smcy homolog, X-linked (mouse)), precedentemente conosciuto come JARID1C (Jumonji AT-rich interactive domain 1C) sono state recentemente descritte come cause di XLMR. Questo gene presenta un gene omologo sul cromosoma Y (JARID1D/SMCY). Tutti i geni JARID hanno una forte omologia con i fattori di trascrizione RBBP2 che giocano un ruolo fondamentale nel rimodellamento della cromatina [77].

Quadro clinico

Poiché il gene è stato identificato molto recentemente, sono ancora pochi i casi descritti per cui il quadro clinico comprende pochi aspetti. Questi pazienti presentano bassa statura, microcefalia, testicoli piccoli e criptorchidismo, prognatismo o micrognazia, diastasi dei denti, strabismo, miopia o ipermetropia, ipotonia facciale. Le manifestazioni neurologiche presenti possono

essere l'epilessia e la paraplegia spastica progressiva. Un solo caso di NS-XLMR è stato descritto in una famiglia che presentava caratteristiche meno accentuate rispetto agli altri pazienti riportati [44] [45].

1.5.11 Deficit del trasportatore di Creatina

Mutazioni del gene SLC6A8 sono responsabili del deficit del Trasportatore di Cr; uno degli errori congeniti primari del metabolismo della Cr recentemente descritto che sarà oggetto di trattazione della presente tesi.

1.6 Protocollo diagnostico di XLMR

Malgrado gli sforzi dei ricercatori di tutto il mondo, la maggior parte dei pazienti con RM non ha ancora una diagnosi molecolare a causa dell'elevata eterogeneità della malattia e della difficoltà di selezionare i geni da testare in ciascun caso. L'identificazione di mutazioni dello stesso gene in pazienti con S-XLMR e NS-XLMR ha complicato il problema in quanto l'esclusione dei geni coinvolti nel RM sindromico dall'analisi nei pazienti con NS-XLMR o viceversa non è applicabile "a priori". L'analisi delle mutazioni può essere indirizzata verso un gene responsabile di XLMR solo quando i pazienti presentano uno specifico fenotipo, suggestivo di una sindrome X-linked per il quale il gene in causa è stato identificato, o quando essi sono in linkage con la regione genomica contenente il gene. In assenza di questi requisiti, la sola possibilità diagnostica è uno screening generalizzato di tutti i geni legati al XLMR. Per queste ragioni, al giorno d'oggi, solo un numero limitato di pazienti può ricevere una diagnosi molecolare [16]. Un modo per ovviare a questo problema potrebbe essere quello di un approccio clinico step-by-step:

Anamnesi Il primo step per la diagnosi è la raccolta accurata della storia clinica sia personale che familiare per cui si dovrà ricostruire l'albero genealogico almeno delle tre generazioni precedenti e descrivere minutamente lo sviluppo di tutti i parenti possibilmente affetti; raccogliere

informazioni sulla salute materna prima della gravidanza, sul decorso della gravidanza, sulle modalità del parto e sulla storia neonatale (peso, lunghezza, circonferenza cranica, APGAR, sofferenza neonatale...), sulle tappe di sviluppo postuomotorio, sulla velocità di crescita.

Esame obiettivo Sono consigliabili esami atti a determinare la presenza di dismorfismi, anche lievi, importanti per la diagnosi differenziale (Fig. 1.5). Successivamente è importante eseguire un esame neurologico accurato e una valutazione neuropsichiatrica del cognitivo, del linguaggio e del comportamento.

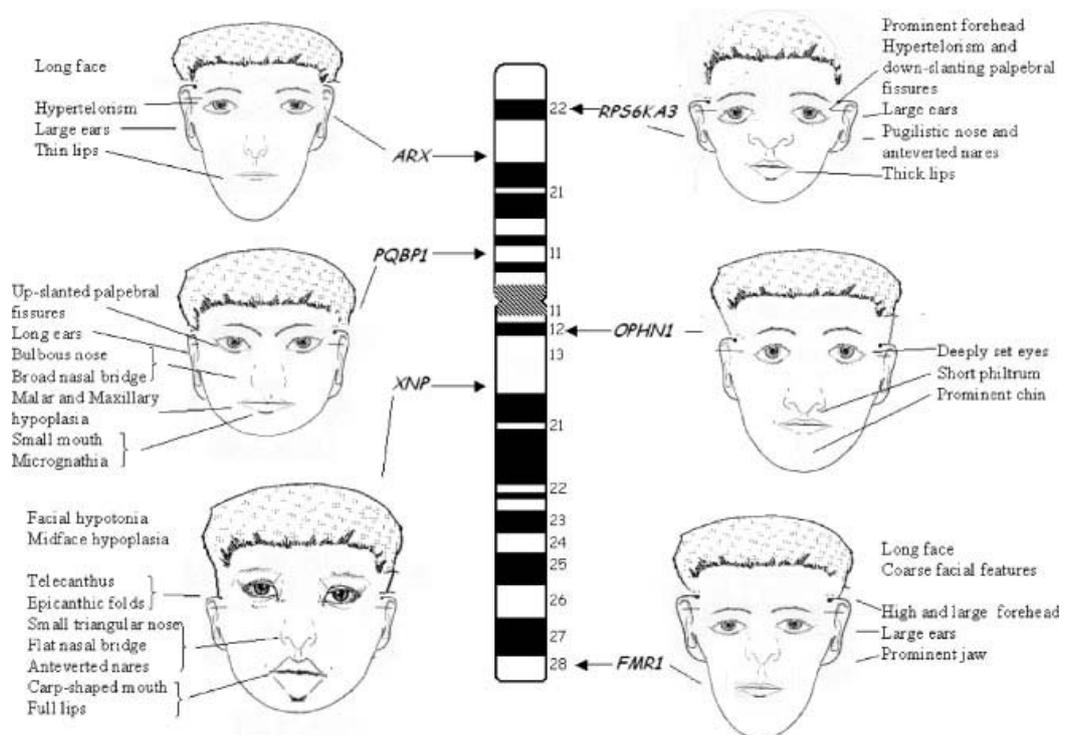


Figura 1.5: Caratteri dismorfici presenti in alcune sindromi legate al XLMR. Tratto da Renieri 2005 [16].

Esami di laboratorio In tutti i pazienti in cui si sospetta un XLMR può

essere utile eseguire innanzitutto un'analisi del cariotipo (risoluzione di banda >500), uno studio genetico molecolare per FRAXA e FRAXE, uno studio dei telomeri. Si dovrebbe poi eseguire uno screening per malattie metaboliche tramite il dosaggio degli aminoacidi plasmatici ed urinari, degli acidi organici urinari e dei mucopolisaccaridi urinari completando con la determinazione del rapporto Cr/Crn nel plasma e nelle urine utile per la diagnosi di deficit del CTRT. Basandosi sul fenotipo particolare del paziente andranno eseguiti esami genetici specifici per la ricerca del gene mutato coinvolto (Fig. 1.6).

Caratteristiche	Geni
Microcefalia	ATRX, MECP2, PQBP1, SMCX
Palatoschisi	PQBP1
Malattie congenite cardiache	PQBP1
Paraplegia spastica	SLC16A2, ATRX, SMCX, MECP2
Crisi epilettiche	AGTR2, SYN1, ATRX, SLC6A8, ARX, SMCX
Disturbi del linguaggio	ATRX, SLC16A2, SLC6A8
Ipoplasia cerebellare	OPHN1
Bassa statura	PQBP1, SMCX
Comportamento autistico	NLGN3, NLGN4, AGTR2, SLC6A8
Distonia	ARX
Ipertelorismo	RSK2
Scoliosi	RSK2, ATRX
Anomalie delle funzioni tiroidee	SLC16A2

Figura 1.6: *Associazione fenotipo-genotipo del XLMR. Tratto da Raymond 2006 [46].*

Esami strumentali Tra gli esami strumentali utili alla caratterizzazione del quadro clinico e alla diagnosi differenziale sono consigliabili: EEG sonno/veglia alla ricerca di anomalie epilettiformi e di un possibile pattern specifico; RMN cerebrale e la RM Spettroscopica che permette di studiare in modo non invasivo le concentrazioni di alcuni metaboliti

cerebrali ritenuti importanti dal punto di vista clinico. Nello spettro normale, letto da destra a sinistra, i metaboliti che costituiscono i picchi più importanti sono: NAA, presente nella popolazione neuronale e utilizzato come marker specifico del danno neuronale, Cr/PCr, avente un ruolo nel mantenimento dei sistemi energia-dipendenti nelle cellule dell'encefalo e la cui riduzione o assenza del picco permette la diagnosi degli errori congeniti del metabolismo della Cr, Colina (Cho), costituente del metabolismo fosfolipidico delle membrane cellulari e indicatore del turnover di membrana, mioinositolo (mI), zucchero presente in concentrazioni elevate nelle cellule gliali, considerato quindi un marker gliale. Nell'encefalo normale l'ampiezza dei principali metaboliti si modifica in funzione dell'età, con un aumento graduale dei livelli di NAA legato a un incremento del numero di assoni, dendriti e connessioni sinaptiche e con una riduzione di Cho e mI legata al passaggio da un turnover cellulare aumentato ad uno relativamente stabile, e in funzione della sede anatomica presa in considerazione in quanto il rapporto Cho/Cr è significativamente più elevato nella sostanza bianca rispetto alla sostanza grigia (Fig. 1.7).

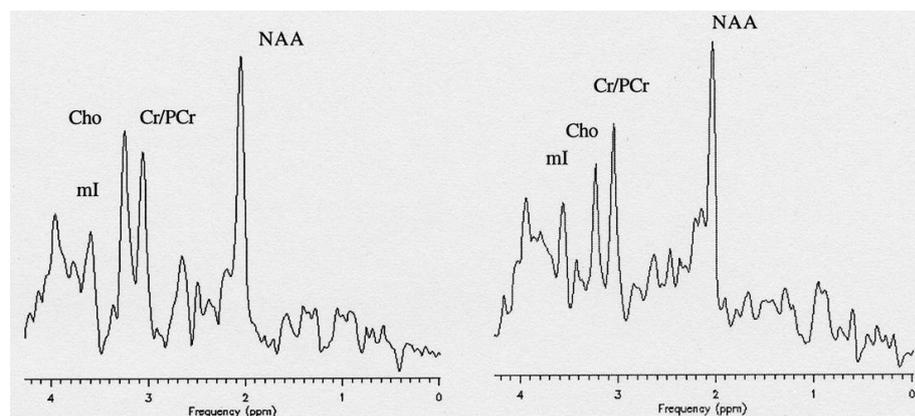


Figura 1.7: Spettroscopia protonica normale in corrispondenza della sostanza bianca (sinistra) e della sostanza grigia corticale interemisferica (destra).

In Fig.1.8 sono sintetizzati i vari step dell'iter diagnostico del XLMR descritti (Fig. 1.8).

Iter diagnostico del XLMR	
Anamnesi:	Ricostruire l'albero genealogico delle tre generazioni precedenti
	Storia della gravidanza
	Tappe di sviluppo postuomotorio
Esame Obiettivo:	Ricerca dismorfismi maggiori e minori
	Esame neurologico
	Valutazione funzionale (livello cognitivo, es. linguaggio, comportamento)
Esami di laboratorio:	Analisi del cariotipo (risoluzione di banda >500)
	Studio genetico molecolare per FRAXA e FRAXE
	Studio dei telomeri
	Screening metabolico (dosaggio degli aminoacidi plasmatici ed urinari, degli acidi organici urinari, dei mucopolisaccaridi urinari, Cr, Crn, GAA nelle urine e nel plasma)
Esami strumentali:	EEG sonno / veglia
	RMN cerebrale
	RM Spettroscopica (¹ H-MRS)

Figura 1.8: *Iter diagnostico del XLMR. Modificato da Raymond 2006 [46].*

In Fig.1.9 abbiamo schematizzato con un algoritmo diagnostico il rapporto fenotipo-genotipo delle sindromi del XLMR descritte in questo capitolo (Fig. 1.9).

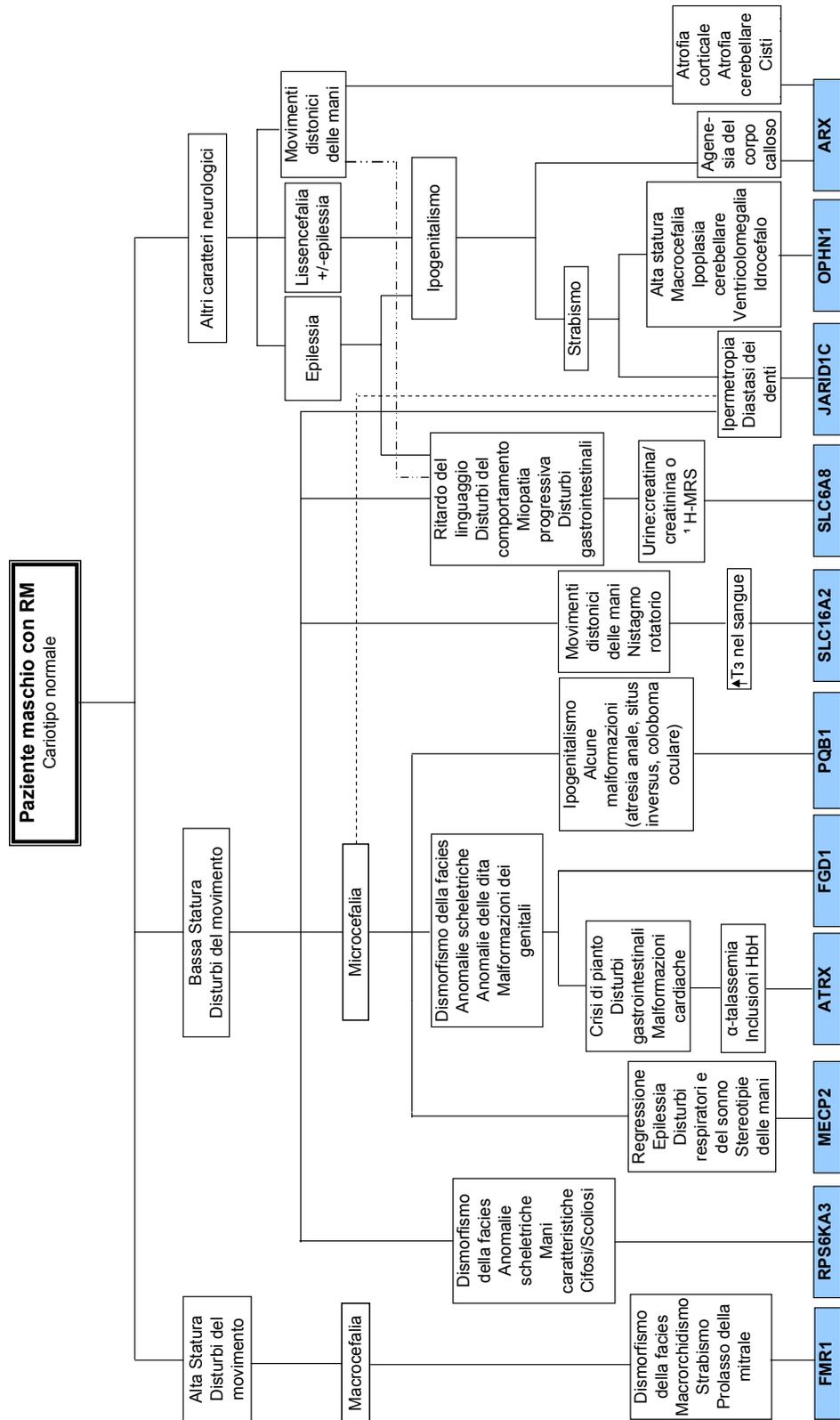


Figura 1.9: Algoritmo diagnostico: rapporto fenotipo-genotipo delle sindromi del XLMR descritte in questo capitolo. Modificato da kleefstra 2005 [18].

Capitolo 2

SLC6A8: un nuovo errore congenito del metabolismo della Creatina

Il deficit di Creatina (Cr) è un errore congenito del metabolismo, recentemente descritto, di grande interesse sia sul piano clinico che su quello scientifico. In primo luogo i disturbi primari della Cr possono fornire informazioni e approfondimenti sul metabolismo e sul sistema di trasporto della Cr nei soggetti normali ed in condizioni patologiche. Inoltre, tali disordini presentano sintomi molto frequenti nella patologia neuropsichiatrica dell'età evolutiva, come il RM, il disturbo del linguaggio, l'epilessia, i disturbi del movimento e della relazione-comunicazione, che spesso rimangono senza una diagnosi eziologica certa. In secondo luogo, i rilevanti benefici ottenuti con la supplementazione terapeutica con Cr, rendono tali patologie suscettibili di trattamento ed impongono quindi una necessaria e precoce diagnosi. Il deficit di Cr può essere determinato da alterazioni nei meccanismi di sintesi della Cr per deficit degli enzimi implicati: Arginina-Glicina Amidinotransferasi (AGAT) e Guanidinoacetato Metiltransferasi (GAMT) o per deficit del Trasportatore (CRTR).

2.1 Metabolismo della Creatina

Nell'uomo la Cr è assunta per il 50% con la dieta (principalmente proteine animali) e per il 50 % viene sintetizzata *de novo* nel fegato e nel pancreas utilizzando Arginina, Glicina e Metionina come substrati (Fig. 2.1).

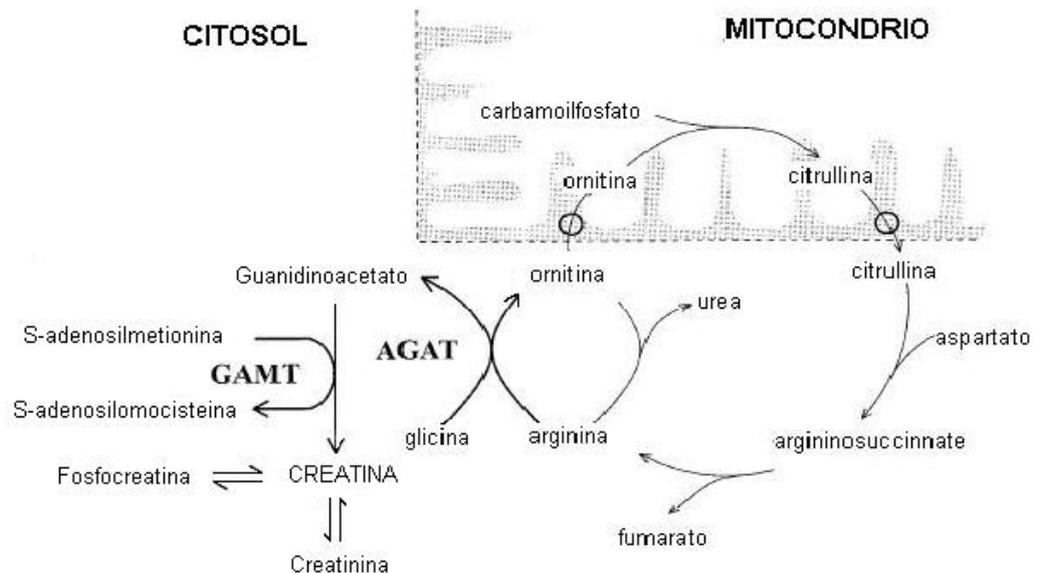


Figura 2.1: *Sintesi della creatina.*

La **prima tappa** della sintesi di Cr è catalizzata dall'enzima AGAT, codificato da un gene localizzato sul cromosoma 15q15.3, che permette il trasferimento di un gruppo guanidinico dall'Arginina alla Glicina con formazione di acido guanidinoacetico (GAA) e Ornitina. La localizzazione dell'enzima nello spazio intermembrana mitocondriale permette la separazione di questa reazione da quelle che maggiormente utilizzano l'arginina come substrato. L'attività enzimatica dell'AGAT è indotta dalla tiroxina e dall'ormone della crescita mentre è inibita dalla Cr e dall'ornitina che è un prodotto della reazione catalizzata, per cui questa tappa è autolimitante. L'assenza di AGAT comporta deficit di Cr cerebrale e bassi livelli di GAA nei liquidi biologici.

La **seconda tappa** della sintesi di Cr è catalizzata dall'enzima GAMT, localizzato sul cromosoma 19p13.3, che utilizza come substrati il GAA e l'S-adenosilmetionina con formazione di Cr e S-adenosilomo-cisteina. Il deficit di tale enzima comporta la presenza di elevati livelli di GAA e bassi livelli di Cr nel plasma, nelle urine e nel liquor.

Una volta sintetizzata, la Cr si accumula principalmente nei tessuti con maggiore richiesta energetica, vale a dire nel tessuto muscolare scheletrico e in quello nervoso, grazie alla presenza di un trasportatore transmembrana (CRTR) appartenente alla famiglia dei trasportatori Na-dipendenti. Il gene del Trasportatore, detto "SLC6A8" (MIM300036) e anche conosciuto come "CT1" o "CRTR" è stato mappato sul cromosoma Xq28 [47]. La concentrazione di Cr regola l'espressione del CRTR con un meccanismo a feed-back negativo: sembra, infatti, che la Cr induca la sintesi di un inibitore del gene che codifica per il trasportatore. L'alterazione di questo trasportatore è causa del deficit di Cr cerebrale che si caratterizza per i normali livelli di Cr e di GAA nel plasma e nelle urine associati a basse concentrazioni di Cr a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC) [48] [49] e ad un aumento del rapporto Cr/Crn. Nelle cellule muscolari, parte della Cr viene fosforilata formando la fosfocreatina (PCr). Il sistema Cr/PCr costituisce una riserva energetica fondamentale per le cellule, soprattutto per quelle ad alta richiesta d'energia, come le fibre muscolari a rapida contrazione e le cellule nervose. La PCr permette cioè di mantenere costante il livello cellulare di ATP attraverso il trasferimento di un gruppo fosforico all'ADP con formazione di ATP. Questa reazione è reversibile ed è catalizzata dall'enzima creatinichinasi [50] [51]. Cr e PCr intracellulari sono convertite in creatinina (Crn) attraverso tappe non catalizzate da enzimi; il turnover giornaliero è costante e corrisponde all' 1,5% della Cr presente nell'organismo. L'eliminazione della Crn avviene attraverso la via renale e l'escrezione urinaria risulta direttamente proporzionale alla concentrazione corporea di questo metabolita. Nell'adulto sano l'eliminazione giornaliera di Crn proviene da un pool di 120 g di Cr e PCr e varia da 1,5 g a 2 g [52].

2.2 Deficit di sintesi

I deficit di AGAT e GAMT sono patologie autosomiche recessive caratterizzate da uno specifico quadro clinico e biochimico.

2.2.1 Quadro clinico

Deficit di AGAT Il deficit cerebrale di Cr legato all'alterazione dell'AGAT, è caratterizzato dalla presenza di RM, ritardo del linguaggio e comportamento simil autistico. E' stato descritto soltanto in tre pazienti italiani, due sorelle di 5 e 3 anni ed un loro cugino di secondo grado di 2 anni, afferiti all'Istituto Scientifico Stella Maris per ritardo mentale e ritardo del linguaggio associati a disturbo della relazione e del comportamento [53] [54] (Fig. 2.2).

Sorella 1 (5 anni)	Sorella 2 (3 anni)	Cugino (2 anni)
<ul style="list-style-type: none"> • Microcefalia e iposomia • Ritardo mentale • Ritardo del linguaggio espressivo • Disturbo del comportamento con tratti similautistici 	<ul style="list-style-type: none"> • Microcefalia e iposomia • Ritardo mentale • Assenza di linguaggio espressivo • Ipotonia e impaccio motorio • Disturbi del comportamento con tratti similautistici 	<ul style="list-style-type: none"> • Normale accrescimento staturale ponderale • Ritardo psicomotorio • Assenza di linguaggio espressivo • Disturbi del comportamento con tratti similautistici

Figura 2.2: *Quadro clinico nei tre pazienti con deficit di AGAT.*

All'interno della stessa famiglia è stata fatta diagnosi presintomatica di deficit di AGAT in un maschio, fratello delle due bambine precedentemente descritte. Alla nascita l'esame neurologico era normale, ma gli esami biochimici e strumentali hanno permesso una diagnosi precoce di deficit di AGAT. L'esecuzione della 1H-RMS dopo 3 settimane di vita ha dimostrato la completa assenza del picco cerebrale di Cr confermando la diagnosi di deficit di AGAT. Per correggere il deficit di Cr, poichè il neonato era allattato al seno, è stata supplementata la dieta materna con Cr monoidrato e dopo lo

svezzamento il neonato passò ad assumere direttamente la Cr. Non conoscendo i dosaggi tossici sono stati somministrati basse dosi (100 mg/kg/die divisi in 5 dosi). Ad oggi lo sviluppo somatico e psicomotorio del neonato è completamente normale e gli unici effetti collaterali del trattamento sono episodi diarroici quando viene iniziato il trattamento o viene modificata la dose per variazioni del peso [55].

Deficit di GAMT Il deficit cerebrale di Cr legato all'alterazione del GAMT é caratterizzato da un quadro clinico che rispetto al deficit di AGAT presenta oltre al RM e ritardo del linguaggio, epilessia farmaco resistente e segni extrapiramidali e/o piramidali. Il deficit di GAMT è stato il primo errore congenito del metabolismo della Cr scoperto nell'uomo [56]. I numerosi altri casi descritti successivamente, hanno permesso di affermare che tale deficit può manifestarsi in una forma severa [57] [58] [59], caratterizzata da epilessia farmacoresistente, precoce ritardo dello sviluppo con assenza di linguaggio, disturbi extrapiramidali ed alterazioni morfostrutturali in RMN, e in una forma più moderata [60], che comprende, oltre al RM con assenza di linguaggio, disturbi del comportamento ed epilessia trattabile. Appare molto interessante il fatto che in questi pazienti non si abbia nessun segno di cardiomiopatia né di danno muscolare scheletrico, nonostante il ruolo importante della Cr nel metabolismo energetico di tali tessuti

2.2.2 Pattern biochimico e spettroscopico

I dosaggi biochimici di Cr, Crn e GAA sui fluidi biologici, in particolare plasma e urine, possono essere effettuati con cromatografia (HPLC) o con la recente applicazione di strumentazioni spettrometriche di massa su campioni di urine, su sangue eparinato o su spot di sangue essiccato su carta bibula come quello prelevato per lo screening neonatale degli errori congeniti del metabolismo [61] [62].

Deficit di AGAT Ridotti livelli di Cr e Crn con ridotti o assenti livelli di GAA sono espressione di un deficit di AGAT. La RMN encefalo nei tre bambini descritti presso il nostro Istituto non ha mostrato alterazioni del

parenchima cerebrale mentre la 1H-RMS ha rilevato l'assenza del picco di Cr/Crn a livello della sostanza bianca paraventricolare, del cervelletto e della corteccia parieto-occipitale. Anche nel neonato l'esecuzione della 1H-RMS dopo 3 settimane di vita ha dimostrato la completa assenza del picco cerebrale di Cr (Fig. 2.3).

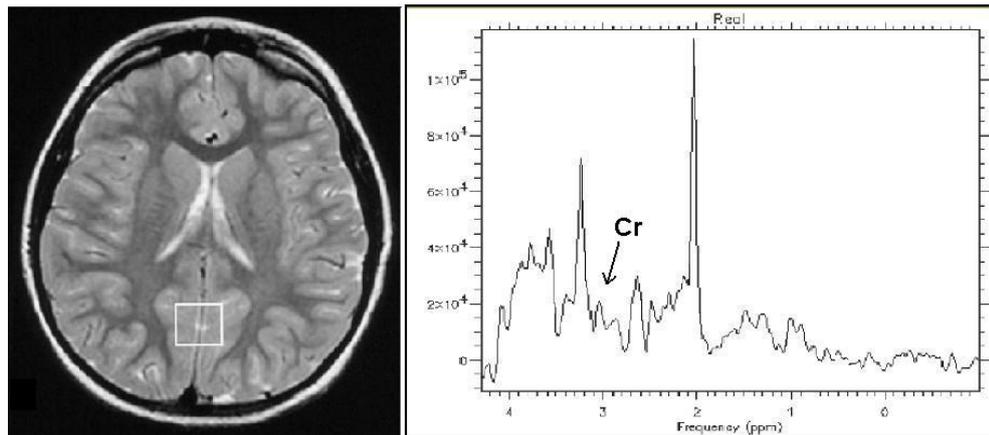


Figura 2.3: *RMN cerebrale e RM Spettroscopica della sorella 1 simili a quelle degli altri casi descritti di deficit di AGAT. Nella RMN, il quadrato presente in corteccia parieto-occipitale indica il voxel per la RMS.*

Deficit di GAMT Ridotti livelli di Cr cerebrale e ridotti livelli di Cr e Crn nel plasma e nelle urine con elevate concentrazioni di GAA, precursore della Cr, caratterizzano il deficit GAMT. La RMN ha dimostrato in molti casi descritti un'alterata intensità di segnale nel globo pallido. La 1H-RMS ha rilevato l'assenza del picco di Cr/Crn.

In fig 2.4 sono riportati i valori plasmatici e urinari di Cr, Crn e GAA dei pazienti con deficit di AGAT e GAMT descritti presso il nostro Istituto (Fig. 2.4).

2.2.3 Mutazioni genetiche

Deficit di AGAT Lo studio del gene ha permesso la localizzazione sul cromosoma 15q15.3 e ha evidenziato una mutazione nonsense in omozigosi in

	Deficit di GAMT	Deficit di AGAT		
		Sorella 1 (5 anni)	Sorella 2 (3 anni)	Cugino (2 anni)
Cr plasma (v.n.: 10-200 $\mu\text{mol/L}$)	-	95 $\mu\text{mol/L}$	122 $\mu\text{mol/L}$	53 $\mu\text{mol/L}$
GAA plasma (v.n.: 0.4-3.0 $\mu\text{mol/L}$)	18.6 μM	0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.3 $\mu\text{mol/L}$	-
Crn plasma (v.n.: 0.6-1.1 mg/dl)	0.5 mg/dl	0.4 mg/dl	0.3 mg/dl	0.33 mg/dl
Cr urine (v.n.: 40-360 mmol/mlCr)	-	28 mmol/mlCr	33 mmol/mlCr	252 mmol/mlCr
GAA urinario (v.n.: 10-125 mmol/mlCr)	1783 μM	2 mmol/mlCr	2 mmol/mlCr	2 mmol/mlCr
Crn urinaria (v.n.: 80-180 mg/dl)	5.9 mg/kg/die	46 mg/dl	52 mg/dl	-

Figura 2.4: Valori plasmatici e urinari di Cr, Crn e GAA dei pazienti con deficit di AGAT e GAMT descritti presso il nostro Istituto.

posizione 9093A>G che determina la conversione di triptofano in un codone di stop a livello del residuo 149 (W149X) sia nelle bambine [53], sia nel loro cugino [54], sia nel neonato [55].

Deficit di GAMT Le indagini di genetica molecolare eseguite nei vari casi descritti hanno permesso di individuare diverse mutazioni (Fig. 2.5).

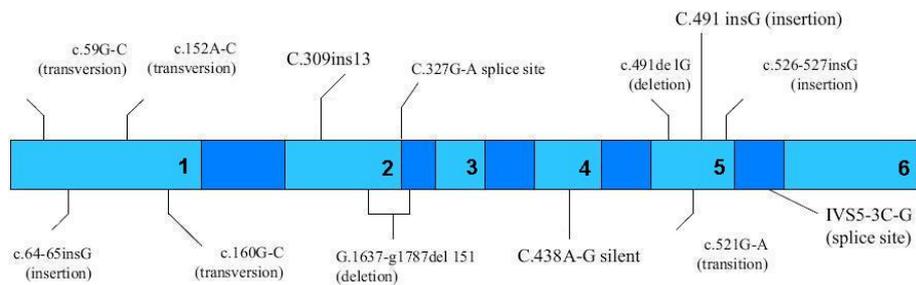


Figura 2.5: Mappa delle mutazioni del GAMT.

2.2.4 Terapia

Il deficit di sintesi della Cr può essere corretto con la somministrazione orale di Cr monoidrato. Le dosi utilizzate variano tra 350 mg/Kg/die e 2 g/Kg/die. La dose di 350 mg/Kg/die, corrispondente a 20 volte circa il fabbisogno giornaliero di Cr, sembra comunque non provocare effetti collaterali in soggetti sani volontari [64].

Deficit di AGAT Nei casi descritti la terapia con Cr monoidrato per os alle dosi di 400 mg/Kg/die ha determinato un ripristino delle concentrazioni di Cr cerebrale ed un contemporaneo e graduale progresso nello sviluppo neurologico. Il follow-up terapeutico è stato monitorato con la $^1\text{H-RMS}$ ed il recupero del picco cerebrale Cr/PCr è giunto al 90% in tutti e tre i casi consentendo la riduzione della dose di Cr a 200 mg/Kg/die [65] [54](Fig. 2.6).

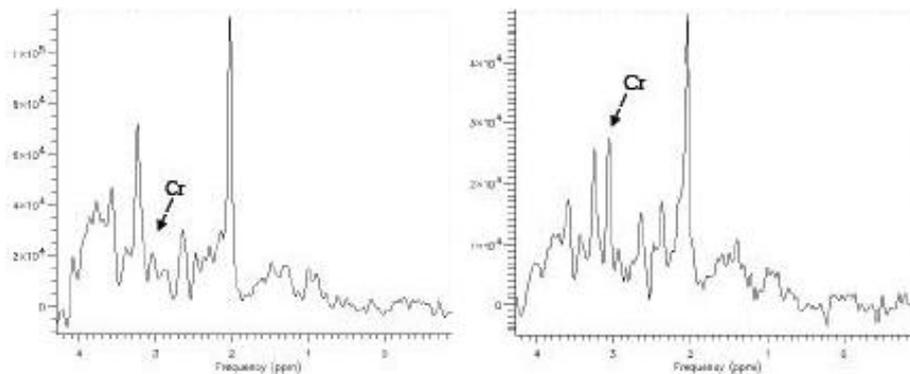


Figura 2.6: *RM Spettroscopica del cugino all'esordio della malattia (a destra) e dopo 16 mesi di terapia (a sinistra).*

I buoni risultati della supplementazione terapeutica supportarono l'ipotesi che una diagnosi e un trattamento precoci possano contribuire ad un ulteriore miglioramento prognostico come dimostrato dall'efficacia della terapia sostitutiva con Cr alle dosi di 100 mg/Kg/die nel neonato [55].

Deficit di GAMT In tutti i pazienti con deficit di GAMT descritti e trattati con supplementazione di Cr persiste una sintomatologia neurologica, molto più importante di quella presente nei pazienti con deficit di

GAMT. Questo potrebbe essere dovuto in parte ad un danno cerebrale già verificatosi al momento della diagnosi, da qui l'importanza della diagnosi precoce, ma anche alla difficoltà di riportare i livelli di GAA nei fluidi biologici nel range della normalità, in particolare nel liquor dove rimangono elevati [59]. Nonostante l'attività dell'AGAT sia controllata principalmente dalla Cr con un meccanismo di feed-back negativo, la somministrazione di Cr ad alte dosi determina solo una modesta riduzione ma non la normalizzazione dei livelli di GAA. Per tale motivo sono state messe a punto strategie terapeutiche complementari alla supplementazione con Cr nel tentativo di ridurre ulteriormente il GAA: somministrazione di Ornitina esogena per indurre un'inibizione competitiva dell'AGAT [66] e restrizione dietetica di Arginina, precursore del GAA e substrato dell'AGAT [67]. L'associazione della supplementazione di Cr con ambedue tali presidi terapeutici porta ad un'ulteriore riduzione di GAA e contemporaneamente ad un significativo miglioramento delle condizioni cliniche [67].

Nella figura 2.7 abbiamo riassunto le principali caratteristiche dei deficit della Cr (Fig. 2.7).

	Clinica	Biochimica	Test Diagnostici	Terapia
Deficit di AGAT	Ritardo mentale Ritardo del linguaggio	↓ Cr cerebrale ↓ o N GAA ↓ Crn plasma, urine ↓ Cr plasma, urine	¹ H-RMS cerebrale Dosaggio GAA Crn (urine 24h o fresche) Cr urine e plasma	Creatina: da 200 mg/Kg/die a 2g/Kg/die
Deficit di GAMT	Ritardo mentale Ritardo del linguaggio Epilessia farmacoresistente Segni extrapiramidali e/o piramidali	↓ Cr cerebrale ↑ GAA ↓ Crn plasma, urine ↓ Cr plasma, urine	¹ H-RMS cerebrale Dosaggio GAA Crn (urine 24h o fresche) Cr urine e plasma	Creatina: da 200 mg/Kg/die a 2g/Kg/die Arginina: 25 mg/Kg/die Ornitina: 100 mg/Kg/die

Figura 2.7: *Schema riassuntivo delle caratteristiche cliniche, degli esami biochimici, dei test diagnostici e delle proposte terapeutiche dei deficit di sintesi della Cr.*

2.3 Deficit del Trasportatore

Il deficit del Trasportatore della Cr (CRTR) è uno degli errori congeniti primari del metabolismo recentemente descritto, causato da mutazioni del gene *SLC6A8* e trasmesso con modalità recessiva X-linked. Rappresenta una delle cause più importanti di XLMR, ancora poco spesso diagnosticato per cui la sua frequenza sembrerebbe maggiore rispetto a quella riportata. Un primo studio fu condotto da Rosenberg nel 2004 su 288 pazienti con RM selezionati per eredità X-linked provata e per la presenza di due o più maschi affetti in famiglia. Dall'analisi del gene *SLC6A8* furono identificate 6 mutazioni, di cui 5 nuove, in 288 pazienti con una prevalenza, quindi, di circa 2,1% (6/288) [68]. Da questo studio potrebbe sembrare che la prevalenza del deficit di CRTR sia simile a quella della sindrome dell'X fragile stimata al 2-3%. In realtà questa prevalenza della sindrome X fragile è riferita ad uno studio in cui i pazienti non erano stati selezionati per storia familiare; in tal caso invece era del 27% per cui il deficit del CRTR è circa dieci volte meno frequente [69]. In un studio più recente condotto da Clark su 478 maschi con RM di origine sconosciuta è stato dimostrato che la prevalenza delle mutazioni di *SLC6A8* è in realtà dello 0,8% [70]. Ci soffermeremo in particolare nella descrizione di questo nuovo quadro clinico, recentemente diagnosticato in un paziente presso l'Istituto Stella Maris e che sarà oggetto della parte sperimentale di questo lavoro.

2.3.1 Quadro clinico

Il primo caso di deficit del CRTR è stato riportato da **Cecil nel 2001**. Le caratteristiche cliniche di tale bambino comprendevano all'esordio (7 mesi) un lieve ritardo dello sviluppo e ipotonia assiale. A 2 anni di età seguì la comparsa di uno stato epilettico parziale. Il tracciato EEG mostrava anomalie parossistiche multifocali e la RMN evidenziava una piccola area di iperintensità nella regione periventricolare posteriore destra. A 6 anni il bambino presentava macrocefalia, un severo ritardo del linguaggio, una leggera ipoto-

nia, ma con abilità motorie normali, una scarsa partecipazione all'ambiente, nonostante il buon aggancio oculare, crisi epilettiche parziali controllate con carbamazepina. Le alterazioni della RMN permanevano invariate rispetto alla prima osservazione. Una 1H-RMS mostrò una completa assenza del segnale di Cr. Si effettuarono gli esami biochimici sui fluidi biologici da cui risultarono valori di GAA normali e di Cr aumentati nelle urine e nel plasma. Analogamente ai deficit di sintesi di Cr, fu intrapresa una terapia sostitutiva con Cr monoidrato per os (340 mg/kg/die per 3 mesi), ma la 1H-RMS non evidenziò il ripristino del picco della Cr cerebrale. Questi risultati, insieme all'assenza di un miglioramento delle condizioni cliniche, portarono all'interruzione della somministrazione della terapia sostitutiva e all'ipotesi diagnostica di un deficit del CRTR a livello cerebrale in quanto i livelli di Cr e Crn plasmatici ed urinari risultarono aumentati in corso di terapia, segno di un perfetto funzionamento degli enzimi AGAT e GAMT [48].

Il paziente era figlio unico di genitori sani, anche se sia sua madre che sua nonna avevano una storia di ritardo dell'apprendimento. La madre aveva due fratelli: una sorella sana e un fratello con un ritardo severo. Il fatto che i maschi erano più severamente colpiti suggerì la presenza di una patologia X-linked che fu confermata dal riscontro di una mutazione nonsense del gene *SLC6A8* del CRTR localizzato sul cromosoma Xq28, in particolare una traslocazione 1539C→T determina la sostituzione di una Arginina con un codone terminale (R514 X) per cui la proteina risultava costituita da solo 513 amminoacidi e mancava dei 122 amminoacidi della porzione C-terminale [71].

Il deficit del CRTR è stato anche dimostrato con lo studio dell'uptake di Cr nei fibroblasti. Incubando i fibroblasti del paziente, dei parenti portatori della mutazione e di alcuni controlli si è dimostrato che sia a concentrazioni fisiologiche di Cr di 25 μM sia a concentrazioni di 125 μM nei soggetti affetti non vi era uptake della Cr confermando l'assenza di un trasportatore funzionale. A concentrazioni di 500 μM fu dimostrato un uptake della Cr pari a circa 1/3 rispetto ai controlli dovuto o alla diffusione passiva della Cr

attraverso la membrana cellulare o alla presenza di altri neurotrasportatori. L'incubazione dei fibroblasti per 24h con 500 μM di Cr e 500 μM di guanidinopropionato, un inibitore del CRTR, mostrò una riduzione dell'uptake nelle cellule dei portatori e dei controlli, ma non dei pazienti con deficit di CTRT. Non furono osservate sostanziali differenze tra le cellule dei portatori e quelle dei controlli [71]. La Spettroscopia muscolare dimostrava la presenza di normali concentrazioni di Cr e riduzione della PCr nel tessuto muscolare senza segni clinici evidenti di miopatia [72].

Dopo questo caso numerosi altri pazienti con un quadro clinico simile sono stati descritti. Abbiamo avuto anche in Italia un caso rappresentativo di tale patologia, descritto da **Bizzi nel 2002** presso l'Istituto Neurologico Besta di Milano. Era un bambino di 4 anni con un severo RM, assenza di linguaggio e comportamento autistico, non rispondeva ai comandi verbali e mostrava stereotipie motorie. All'età di 16 mesi aveva presentato crisi epilettiche parziali con secondaria generalizzazione seguite da remissione dopo l'introduzione di trattamento antiepilettico con Valproato di sodio [75]. La RMN encefalo dimostrava un'importante asimmetria degli ippocampi, con iperintensità di segnale e atrofia dell'ippocampo destro, suggestiva di un quadro di sclerosi mesiale dell'ippocampo [75].

Una nuova mutazione del gene SLC6A8 è stata descritta in una famiglia olandese da **Mancini nel 2005**. La mamma riferiva di aver avuto difficoltà nell'apprendimento, ritardo nello sviluppo del linguaggio ed episodi epilettici non meglio precisati dai 12 ai 16 anni. Il primo figlio aveva 8 anni ed era nato da una gravidanza complicata da una lieve ipertensione trattata con dieta iposodica e con parto regolare. Dal primo anno di vita, la presenza di difficoltà nell'alimentazione avevano determinato un rallentamento della crescita. L'esame neurologico rivelava la presenza di una lieve sindrome piramidale maggiormente evidente sul lato sinistro; la storia era negativa per epilessia. La deambulazione autonoma, acquisita all'età di 22 mesi, era instabile con difficoltà a correre e scarsa coordinazione, associata ad adiocinesi e ipotonia generalizzata. Il volto era caratterizzato da una fronte

spaziosa, un naso corto, un'inclinazione degli occhi verso il basso, scialorrea. Il linguaggio era limitato a poche singole parole e all'uso di frasi di 3 parole con ecolalia, un disordine del linguaggio semantico-pragmatico con disprassie orali. Sotto il profilo neuropsicologico aveva un QI (50) al limite tra un moderato e severo RM, scarsa capacità di attenzione ma con un buon temperamento. Il secondo figlio aveva 6 anni al momento della diagnosi ed era nato da una gravidanza normodecorsa. A 3 anni presentava un quadro clinico caratterizzato, come per il fratello, da difficoltà nella comprensione e da un ritardo del linguaggio limitato a singole parole con ecolalia, disprassia orale e scialorrea, ma a differenza del fratello presentava anche disartria. La sua andatura era instabile, a base allargata, ma il ritardo motorio sembrava migliorare nel tempo più di quello del linguaggio. In entrambi i pazienti il cariotipo era normale e non vi erano mutazioni dei geni FRAXA e PLP. Gli esami di screening per malattie metaboliche dimostrarono la presenza di valori normali di amminoacidi, sialotransferrine, precursori del colesterolo, lattato, ammonio nel sangue; tuttavia nelle urine furono riscontrati valori elevati di alcuni amminoacidi (istidina, alanina, glicina), acidi organici, mucopolisaccaridi totali, acido sialico. L'analisi del liquido cefalorachidiano del bambino più grande mostrò una riduzione dei valori di 5-HIAA (79 nmol/l; v.n.100-245) e valori normali-bassi di HVA (342 nmol/l; v.n.346-716). All'EEG dei due bambini non era presente attività epilettica ma in quello del bambino più grande il tracciato era lento nella regione frontale dx e mostrava ritmiche onde theta nella regione temporale di dx. La RMN cerebrale del primo paziente, all'età di 4 anni, mostrava una dilatazione dei ventricoli laterali con perdita di sostanza bianca nel corpo calloso e segni di gliosi nelle corna frontali dei ventricoli, più pronunciati a destra. La RMN del secondo paziente era sostanzialmente normale ad eccezione di una live perdita di mielina con assottigliamento del corpo calloso che risultava comunque ben strutturato [78].

Un ulteriore caso italiano di deficit di CTRT è stato riportato da **Schiaffino nel 2005** che ha descritto un bambino figlio di genitori non consanguinei

sani e con un fratello e una sorella anch'essi in buone condizioni di salute. Il paziente fu sottoposto alla prima osservazione all'età di 21 mesi in seguito ad episodi di vomito ricorrente. Il suo peso, la sua altezza e la sua circonferenza cranica erano tutti al di sotto del 3th percentile. Le caratteristiche cliniche dimostrarono la presenza di un ritardo psicomotorio con chiusura relazionale. L'esame neurologico rivelava la presenza di ipotonia centrale con riflessi tendinei normali e assenza di tremori o altri segni di interessamento cerebellare. All'EEG erano presenti lenti e diffusi ipersincronismi con punte anomale multifocali; diffusi e generalizzati "bouffees" parossistici simultanei ai movimenti mioclonici degli occhi e della regione periorale. La RMN mostrava un'iperintensità del segnale in T₂ nella sostanza bianca periventricolare posteriore [79].

Nel **2005 Póo-Argüelles** ha descritto i primi due casi di deficit del CTRT individuati in Spagna. Il primo caso è quello di un bambino di 11 anni, figlio di genitori sani e non consanguinei. La gravidanza, il parto e il periodo neonatale erano decorsi in modo regolare ma il suo sviluppo psicomotorio avevano subito un arresto attorno al primo mese di vita. Aveva cominciato a camminare all'età di 15 mesi, mostrava uno scarso interesse per l'ambiente circostante ed aveva un severo ritardo nell'acquisizione del linguaggio. Ha cominciato una terapia psicologica a 30 mesi, ma si era sottoposto all'osservazione neuropsichiatrica solo a 3 anni con un quadro di assenza del linguaggio e comportamenti tipici dello spettro autistico. A 6 anni aveva presentato la prima crisi epilettica parziale secondariamente generalizzata seguita da altre quattro crisi, l'ultima delle quali era stata seguita da paralisi di Todd; l'EEG evidenziava la presenza di anomalie focali parossistiche per cui fu iniziato un trattamento con carbamazepina. Non aveva ancora acquisito il linguaggio parlato, ma era in grado di capire semplici istruzioni e di usare segni e gesti per comunicare. Il RM continuava ad essere severo.

Il secondo caso è quello di un bambino di 14 anni, giunto alla prima osservazione a 21 mesi per ritardo psicomotorio e problemi del comportamento di tipo autistico. L'esecuzione di una RMN cerebrale all'età di 30 mesi mostrò

segni di atrofia cerebrale e del verme cerebellare. All'età di 8 anni ebbe la prima crisi epilettica parziale secondariamente generalizzata e a 12 anni, dopo un anno senza terapia antiepilettica ebbe una nuova crisi e fu reintrodotta un trattamento con valproato. Il linguaggio inizialmente assente, tendeva a migliorare anche se lentamente (prime parole a 4 anni) con l'acquisizione di circa 20 parole che utilizzava per comunicare e della capacità di eseguire semplici comandi. Persistevano severi disturbi del comportamento come: iperattività, aggressività, atteggiamenti ossessivo-compulsivi [81].

Gli ultimi due casi, descritti da **Anselm nel 2006**, sono caratteristici per la presenza di distonia e movimenti coreoatetoidi, frequenti nel deficit di GAMT ma descritti precedentemente nel Deficit del Trasportatore in un solo caso [76]. Il primo bambino fu sottoposto alla prima osservazione a 30 mesi per valutare un severo ritardo dello sviluppo accompagnato da ipotonia e distonia. Fin dalla nascita furono notati una scarsa assunzione di cibo e una crescita ridotta probabilmente dovuti a difficoltà nella deglutizione e vomito frequente. La distonia fu diagnosticata a 3 mesi quando sviluppo posture anomale degli arti superiori e inferiori, con distonia oromandibolare severa e bruxismo. I riflessi osteotendinei erano lievemente ridotti, non presentava caratteri dismorfici e per il resto l'esame fisico era normale. Il ritardo dello sviluppo e del linguaggio erano severi. Dagli esami di laboratorio risultò un aumento degli acidi organici urinari che fu considerato come risultato di una disfunzione mitocondriale generalizzata. La RMN cerebrale mostrava un iperintensità del segnale nella sostanza bianca periatriale con un assottigliamento dello splenio del corpo calloso. Fu iniziata una terapia farmacologica per i disordini del movimento. Al follow up, un anno dopo, vi era stato un miglioramento del peso e delle condizioni cliniche generali ma persistevano l'ipotonia e lo scarso controllo del capo e attorno ai 33 mesi comparvero anche movimenti coreici non osservati nel quadro iniziale [82].

Il secondo bambino descritto aveva 12 mesi, era il secondogenito di genitori sani non consanguinei, nato da un gravidanza complicata da oligoidramnios. Alla prima osservazione presentava un ritardo dello sviluppo e del

linguaggio, severa ipotonia del capo e del tronco, distonia, debolezza. Presentava lievi dismorfismi della facies con orecchie "a coppa", occhi incavati, dorso del naso prominente e un'esotropia con angolo variabile. La ridotta assunzione di cibo e il basso peso riscontrati precocemente nell'infanzia erano probabilmente dovuti alla presenza di reflusso gastrointestinale. La RMN cerebrale mostrava aree di iperintensità, l'assenza del globus pallido bilateralmente e un ritardo nella mielinizzazione della sostanza bianca con assottigliamento dell'intero corpo calloso. Fu identificata una riduzione dell'attività enzimatica della catena mitocondriale respiratoria e nel sospetto di una malattia mitocondriale furono trattati con coenzima Q₁₀, carnitina e vitamine, ma senza un sostanziale miglioramento inoltre non furono trovate mutazioni mitocondriali. Dopo la diagnosi di deficit del CTRT nel primo caso, la somiglianza del profilo clinico portò a sospettare questa possibilità diagnostica anche in questo caso. Di conseguenza si rivide la RM Spettroscopia e l'assenza del picco di Cr inizialmente trascurato venne riconosciuto. Successivi esami rivelarono normali valori di GAA nel plasma e un marcato aumento del rapporto Cr/Crn. A 3 anni sviluppò movimenti coreoatetoidi che inizialmente erano intermittenti e ben controllati con clonazepam ma dopo divennero più gravi; a 3 anni e 8 mesi sviluppo una retinopatia pigmentosa; a 3 anni e 10 mesi ebbe la prima crisi seguita da uno stato di male, il successivo trattamento con fenobarbital permise il controllo delle crisi successive; a 4 anni aveva ancora difficoltà nel controllo del capo e un linguaggio espressivo non significativo [82].

Dall'analisi dei vari quadri clinici descritti in letteratura è stato possibile tracciare un profilo fenotipico di questa patologia. In particolare, i soggetti affetti sono bambini o adolescenti maschi omozigoti, la patologia infatti è X-linked e recessiva, e presentano un RM da moderato a severo accompagnato da un ritardo del linguaggio caratterizzato da una severa disfasia espressiva, una lieve disfasia recettiva. I pazienti possono, inoltre, presentare disturbi del comportamento come iperattività, condotte ossessivo-compulsive o aggressive ma anche comportamenti simil autistici. Dal punto di vista mo-

torio presentano una ipotonia centrale non associata a debolezza muscolare, ritardo nell'acquisizione delle tappe posturomotorie e la comparsa di distonia e movimenti coreoatetoidi in casi isolati [76] [82]. Spesso rientrano nel quadro clinico crisi epilettiche che, a differenza di quelle tipiche del deficit di GAMT, sono sensibili alla terapia farmacologica. Le femmine portatrici della mutazione sono asintomatiche, tuttavia in alcune è stato osservato un disturbo dell'apprendimento con interessamento delle funzioni del linguaggio e di quelle cognitive visuo spaziali. Il quadro clinico descritto nei pazienti adulti [76] [77], invece, è caratterizzato dalla presenza di bassa statura, ptosi, ipotonia, andatura spastico/distonica, problemi gastrointestinali e disturbi dell'umore e del comportamento (Fig. 2.8).

2.3.2 Pattern biochimico e spettroscopico

I dosaggi biochimici di Cr e Crn, sia nel sangue che nelle urine, dimostrano la presenza di un aumento del rapporto Cr/Crn per un aumento dei valori di Cr e valori di Crn in genere normali tranne in alcuni casi [73] [79] nei quali vi era una leggera riduzione della Crn nel sangue. La concentrazione di GAA nei liquidi biologici è normale consentendo di escludere un deficit di Cr da alterazioni di AGAT e GAMT. Nel primo paziente descritto si dimostrò la presenza di normali concentrazioni di Cr e riduzione della PCr nel tessuto muscolare; inoltre sia in esso che nel primo caso descritto da deGrauw, fu possibile eseguire un prelievo del liquido cefalorachidiano in cui fu dimostrato la presenza di valori di Cr normali [73].

In tutti i casi in cui è stata eseguita la $^1\text{H-RMS}$ cerebrale, è stata osservata una completa assenza o una marcata riduzione del picco di Cr (Fig. 2.9). In vitro, l'incubazione dei fibroblasti in presenza di $25\ \mu\text{M}$ di Cr dopo 24h dimostra una assenza dell'uptake di Cr e a concentrazioni di $500\ \mu\text{M}$ di Cr un uptake ridotto di circa $1/3$ rispetto ai controlli.

Sintomi e segni	Cecil	DeGrauw	Bizzi	Hahn	Kleefstra	Mancini	Schiaffino	Arguelles	Anselm			
Generali												
Numero di pazienti per famiglia	1	2	1	1	2	5	2	2	1	1		
Età (anni)	6	20 / 17	4	2	6 / 8	15 - 66	68 / 64	8 / 6	1.8	11	14	2,5
Neurologici												
Grado del ritardo mentale	moderato-severo	severo	NA	lieve	moderato	severo (5/5)	severo	moderato	moderato-severo	severo	severo	severo
Disturbi del linguaggio	+	2	+	+	2	5	2	2	+	+	+	+
Ipotonia	+	-	-	-	2	2	2	2	+	-	-	+
Crisi epilettiche	+	2	-	-	-	5	-	-	+	+	+	-
Spasticità/distonia/atassia/movimenti coreoatetoidi	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	+
Esame obiettivo												
Bassa statura	-	2	-	-	2	-	2	2	+	+	-	+
Sotto peso	-	-	-	-	2	-	1	2	+	+	-	+
Microcefalia	-	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Ipotonia oro-facciale	-	-	-	-	-	4	2	-	-	-	-	-
Ptosi	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-
Iperestensibilità delle articolazioni	-	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-
Altri												
Disturbi gastrointestinali	-	-	-	-	-	4	2	-	-	-	-	-
Disturbi dell'umore e del comportamento	-	1	-	-	2	5	1	2	+	+	+	-

Figura 2.8: Sintesi delle caratteristiche cliniche nei pazienti maschi con mutazioni in SLC6A8. Modificato da Salomons 2005 [83].

2.3.3 Mutazioni genetiche

L'analisi genetica condotta sia nei pazienti precedentemente descritti, sia negli studi di screening ha rivelato la presenza di diverse mutazioni sul gene del CRTR della Cr presente sul cromosoma Xq28 (Fig. 2.9).

Famiglia	Mutazione	Tipo di mutazione	Esone	Picco Cr (¹H-MRS)
Cecil	p.R514X	Nonsense	11	Assente
deGraw	p.F107del	Delezione di un amminoacido	2	Assente
	p.F408del	Delezione di un amminoacido	7	Ridotto
	p.Y262X (<i>de novo</i>)	Nonsense	5	Ridotto
Bizzi	p.F408del	Delezione di un amminoacido	7	Assente
Hahn	p.G381R	Missense	7/8	NE
Mancini	IVS 10 + 5G>T	Splice error	10	Ridotto
Schiaffino	IVS 1 - 2A>G	Splice error	1	NE
Arguelles	pLys293fsX3	Frameshift	5	Ridotto
	p.F408del	Delezione di un amminoacido	7	Ridotto
Anselm	delezione porzione 3' terminale del gene	Larga delezione	8-13	Assente
Rosenberg	p.Y317X	Nonsense	6	NE
	p.G87R	Missense	1	NE
	p.P390L	Missense		NE
	p.P554L	Missense	12	NE
	p.C337W	Missense		NE
	p.F107del	Delezione di un amminoacido	2	NE
Clark	p.Asn336del	Delezione di un amminoacido	6	NE
	p.Ile347del	Delezione di un amminoacido	7	NE
	1654 + 2C>T	Splice error		NE
	p.Arg391Trp	Missense	8	NE

Figura 2.9: Schema riassuntivo delle mutazioni del gene *SLC6A8* e del tipo di picco di Cr riscontrato alla 1H-RMS cerebrale nei casi di deficit del Trasportatore descritti in letteratura. NE: Non Eseguita. Modificato da Salomons 2005 [83].

2.3.4 Terapia

In seguito alla diagnosi di deficit di Cr cerebrale, in alcuni casi fu intrapreso un trattamento con Cr monoidrato per os. Le dosi utilizzate e i tempi di somministrazione sperimentati furono diversi: 340 mg/Kg/die per 3 mesi [48], 400 mg/Kg/die per 3 mesi e dal quarto mese 700 mg/Kg/die per 8 mesi [75], 400 mg/Kg/die di Cr monoidrato protratta per un anno [81], da 250 mg/kg/die a 750 mg/kg/die [82]. Tuttavia non si ottenne né un miglioramento del quadro clinico né un ripristino del picco di Cr alla 1H-RMS, ma piuttosto l'ulteriore aumento della Cr urinaria fino a 50 volte i valori normali [48] [75]. L'unico effetto collaterale descritto era un incremento ponderale notevole nei pazienti descritti da Poo-Arguelles (13 Kg nel primo caso, 16 Kg nel secondo) [81] [80]. La mancanza del CRTR spiegherebbe l'irreversibilità del deficit.

Capitolo 3

Parte sperimentale

3.1 Descrizione del paziente

Il nostro studio è stato effettuato su un paziente giunto in osservazione all'Istituto Scientifico Stella Maris con un quadro di RM di grado medio con compromissione del linguaggio associato ad impaccio motorio ed epilessia di natura da determinare.

3.1.1 Quadro clinico

La ricostruzione dell'albero genealogico delle generazioni precedenti ha permesso di segnalare nel gentilizio, nella linea paterna, uno zio con storia anamnestica positiva per convulsioni e ritardo del linguaggio espressivo, un cugino con disturbi del comportamento (ristrettezza di interessi e attività stereotipate) e una lontana parente affetta da disturbo psichiatrico non meglio precisato. Il nostro paziente è figlio di genitori sani, nato da seconda gravidanza (la prima esitata in aborto spontaneo al primo mese) decorsa regolarmente fino al sesto mese quando è stata riscontrata ecograficamente una dilatazione dei bacineti renali ed idronefrosi (normalizzazione ai controlli successivi); al settimo mese inoltre si è verificata ipercontrattilità uterina. Il parto è stato espletato tramite cesareo a 39 settimane e 18 giorni per sofferenza fetale durante il travaglio e alla nascita ha presentato pianto valido,

peso di 3650 g, lunghezza 50 cm, Apgar $1^1=8$, $5^1=10$. Il successivo accrescimento staturale ponderale è stato soddisfacente con dati antropometrici costantemente sul 50°percentile; l'alimentazione e il ritmo sonno-veglia sono stati regolari nel primo anno di vita. Dal punto di vista motorio si è assistito a un lieve ritardo nelle varie tappe postuomotorie con raggiungimento della stazione eretta a 16 mesi e della deambulazione autonoma senza appoggio a 18 mesi.

La sua storia successiva è caratterizzata dalla comparsa di crisi epilettiche parziali secondariamente generalizzate con vari tentativi di controllo farmacologico. Il primo episodio convulsivo si è verificato all'età di 13 mesi, in corso di rialzo febbrile ($T=38^{\circ}\text{C}$), ed è stato caratterizzato da perdita di coscienza, sguardo fisso e successiva deviazione dello sguardo a sinistra, ipertono all'emilato destro con scosse tonico cloniche e scialorrea. La persistenza della crisi (circa 5 ore), ha richiesto l'ospedalizzazione del paziente e in tale occasione gli esami effettuati, sia ematici che strumentali (EEG e TC) sono risultati nella norma o normalizzati. E' stato dimesso con terapia farmacologica antiepilettica, Luminalette 3 cpr/die (45 mg/die), e profilassi benzodiazepinica da effettuare in caso di rialzo febbrile. Dopo 10 mesi, mentre era in corso una graduale riduzione della terapia con barbiturico, venne segnalata la comparsa di un secondo episodio convulsivo febbrile con caratteristiche cliniche simili all'episodio precedente, ma di durata inferiore. E' stata quindi riintrapesa una terapia farmacologica con Luminalette 3 cpr/die (45 mg/die). La presenza di irritabilità e sedazione importante hanno condotto il nostro paziente all'età di circa tre anni presso il nostro Istituto dove è stata sostituita la terapia con barbiturico con carbamazepina (Tegretol CR 200 cpr; 2 cpr/die).

Alla nostra prima osservazione il bambino si presentava non solo con una storia di epilessia, ma anche con un quadro di RM con compromissione del linguaggio espressivo caratterizzato dalla presenza di un quadro di disprassia verbale e degli aspetti grafo espressivi associato ad impaccio motorio.

La valutazione psicologica, eseguita durante il ricovero, evidenziava un

quadro caratterizzato da un buon investimento nelle relazioni interpersonali, sia con gli adulti sia con i pari, anche se talvolta emergevano nel comportamento delle condotte di tipo oppositorio-provocatorie e crisi di irritabilità di fronte a richieste dirette. L'interesse per l'oggetto era immediato, ma caratterizzato prevalentemente da schemi ripetitivi ed afinalizzati (svuotare contenitori), tuttavia se sollecitato e stimolato in un rapporto interpersonale emergevano iniziali sequenze di gioco rappresentativo. La partecipazione alle attività era fugace per la presenza di instabilità motoria e labilità attentiva che penalizzano le realizzazioni. Le prestazioni intellettive non-verbali, valutate con scala Griffith, erano riferibili a un RM di grado lieve; prestazioni migliori erano raggiunte alla scala Performance (QS=58) e alla scala coordinazione occhi-mano (QS=57). Il grafismo spontaneo era costituito da segni ripetitivi semi-circolari.

All'esame motorio, il bambino era in grado di mantenere la stazione eretta a base allargata ed a occhi chiusi e di deambulare autonomamente con base allargata ed arti inferiori extraruotati. Gli arti superiori erano mantenuti in posizione di guardia medio-alta in particolare nella corsa. Erano possibili i vari passaggi interposturali e vi era una lieve ipotonia degli arti, mentre la forza e il trofismo muscolare erano nella norma. I riflessi rotulei apparivano vivaci simmetricamente, normoevocabili gli altri. Era presente la pinza superiore bilateralmente anche se il bambino afferrava gli oggetti utilizzando principalmente una presa pluridigitale, con una mano o con l'altra, e non riusciva ad organizzare opportune strategie per eseguire compiti che richiedono una coordinazione bimanuale.

L'analisi della competenza comunicativa evidenziava una produzione verbale spontanea ed un repertorio espressivo molto limitati con semplici produzioni sillabiche e bisillabiche. Per comunicare si avvaleva prevalentemente di un linguaggio extra-verbale fatto di sguardi, mimica, gesti. Erano presenti il pointing richiestivo e dichiarativo ed alcuni gesti referenziali combinati con vocalizzazione. Buona l'intenzionalità comunicativa; il bambino utilizzava gli strumenti comunicativi a sua disposizione per richiedere, tentare,

marcare eventi, condividere esperienze. La comprensione verbale appariva migliore della produzione con un'attenzione al messaggio verbale adeguata all'età cronologica del bambino.

Ad una successiva osservazione, all'età di 8 anni e mezzo, il bambino presentava sempre un comportamento caratterizzato da un buon adattamento in condizioni di interazione spontanea, ma di fronte a richieste dirette di tipo prestazionale comparivano condotte oppositorie ed atteggiamenti provocatori. L'analisi delle prestazioni ottenute dimostra un ritardo più accentuato nel grafismo che è limitato a scarabocchi o, in compiti di copia, alla riproduzione di semplici linee o all'abbozzo della forma circolare. Povero era anche l'uso degli strumenti (es. forbici). Le prestazioni apparivano interferite da un'importante instabilità attentiva, da risposte impulsive, da scarsa tolleranza all'errore che ostacolavano la possibilità di correzione e di riflessione. Si rilevavano inoltre aspetti di rigidità e perseverazione nelle strategie e negli schemi cognitivi mentre erano più sviluppate le strategie associative legate a materiale percettivo e a conoscenze facenti parte del suo bagaglio esperienziale. Il gioco era di tipo funzionale e rappresentativo, inoltre aveva acquisito la capacità di riconoscere i colori e alcune lettere dell'alfabeto. Il livello cognitivo, valutato attraverso l'utilizzo di prove strutturate di tipo non verbale (scala Griffith), era riferibile a un RM di grado medio, con maggior compromissione degli aspetti grafo-espressivi. Le abilità sociali adattative valutate alla Vineland Adaptive Behavior Scales risultavano più evolute rispetto alle abilità valutate ai test psicometrici. Buona l'intenzionalità comunicativa e il bambino aveva acquisito un vocabolario di circa 60 parole a struttura fonotattica di tipo prevalentemente sillabico o consonante-consonante-vocale (CCV), con produzione di combinazioni a tipo parole singole in successione o combinazioni cross-modali. Resta comunque presente disprassia verbale già segnalata nelle osservazioni precedenti mentre appaiono migliorate le prassie dell'autonomia.

3.1.2 Diagnostica neurochimica e genetica

Sono stati eseguiti esami ematochimici di routine e screening metabolici basali (dosaggio di aminoacidi plasmatici ed urinari, di oligosaccaridi, di acidi organici e di mucopolisaccaridi nelle urine delle 24 h) i cui risultati sono stati nella norma; inoltre ha eseguito un esame cromosomico standard e lo studio genetico molecolare per FRAXA risultati anch'essi nella norma. Un EEG sonno/veglia evidenziava la presenza di attività angolare ritmica (2-3 c/s) sulle regioni centro temporali e sul vertice posteriore, favorita dalla chiusura degli occhi e la comparsa di elementi aguzzi o punte sulle aree fronto centrali e sul vertice nel sonno.

Procedendo nella diagnosi differenziale del XLMR abbiamo applicato al nostro paziente il protocollo diagnostico utilizzato nel nostro Istituto per la diagnosi dei deficit di Cr (Fig. 3.1) .

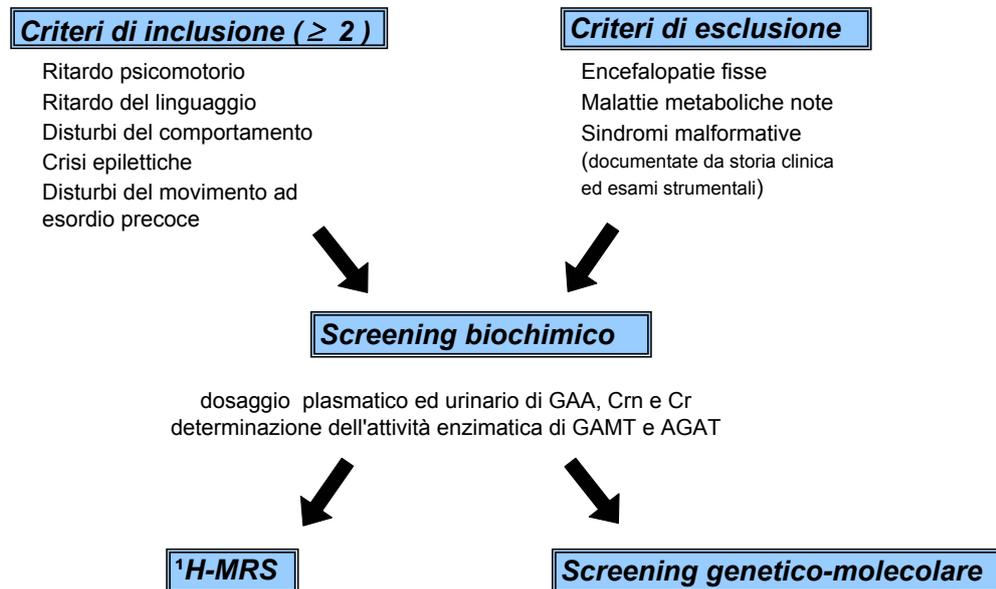


Figura 3.1: *Algoritmo diagnostico dei deficit primari di Cr.*

L'esecuzione di indagini neurochimiche quali il dosaggio di Cr e GAA su sangue ed urine evidenziò un incremento della Cr urinaria ed un elevato rapporto Cr/Crn urinario mentre il GAA nelle urine era nella norma. Questo ha fatto sospettare un deficit primario di Cr da alterazione del trasportatore (SLC6A8) (Fig. 3.2).

Urine	Plasma
Cr 15040 mM (vn. 200-5500)	Cr 80.13 mM (vn. 18-141)
GAA 60.30 mM (vn. 56-698)	GAA 0.25 mM (vn. 0.22-3.14)
Cr/Crn 2.35 (< 1.8)	

Figura 3.2: Risultati degli esami biochimici nel paziente descritto.

La RMN encefalo ha evidenziato una tenue e sfumata iperintensità della sostanza bianca subependimale dei ventricoli laterali, più evidente in regione paratrigonale, bilaterale e simmetrica, da riferirsi alla presenza di modesti esiti gliotici a genesi ipossico-ischemica perinatale, ma non si può escludere che essa sia secondaria alla encefalopatia metabolica in questione (Fig. 3.3).

La RM Spettroscopica ha rilevato un netto decremento dell'ampiezza del segnale della Cr a livello della sostanza bianca sopratrigonale destra e della corteccia parietale in sede interemisferica, confermando la nostra ipotesi diagnostica (Fig. 3.4).

L'analisi genetico-molecolare ha evidenziato la presenza di una delezione nucleotidica c.1006delAAC responsabile della perdita di un amminoacido (Asn336del) nella proteina SLC6A8. La mutazione è *de novo* in quanto i familiari indagati non presentano la mutazione in oggetto (Fig. 3.5).

3.1.3 Profilo neuropsicologico

Il livello cognitivo del nostro paziente, valutato con test psicometrici non verbali come la scala Leiter e la scala Griffiths, si colloca nell'ambito del ritardo medio. Per una migliore definizione del disturbo del linguaggio presentato dal bambino abbiamo applicato specifici test neuropsicologici

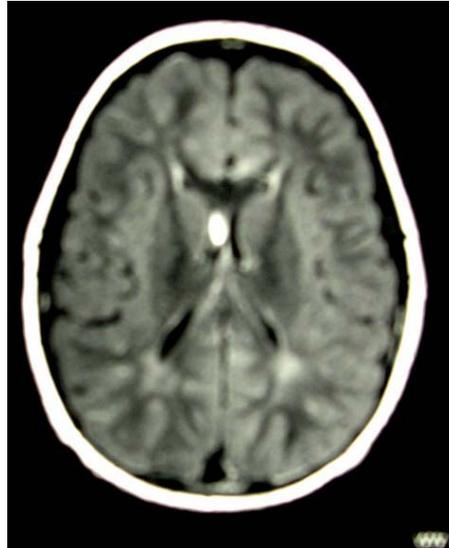


Figura 3.3: *RMN encefalo del paziente descritto.*

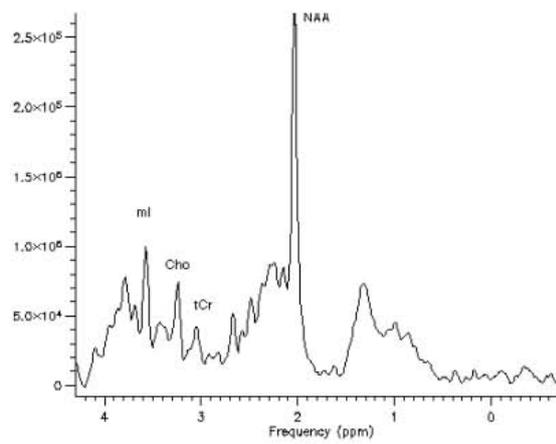


Figura 3.4: *¹H-RMS del paziente descritto.*

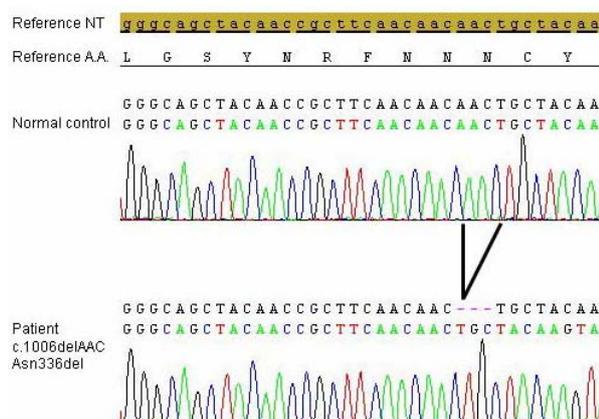


Figura 3.5: *Mutazione genetica del paziente descritto.*

(Schindler, Peabody Picture vocabulary test -PPVT-, Test of Comprehension of Grammar for children -TCGB-, Test di produzione linguistica -TPL-) che hanno messo in evidenza una riduzione delle abilità delle prassie oro-motorie, un pattern atipico di sequenza di fonemi nella sillaba (ad esempio "pzza" per pizza, "blllo" per bello..). In Fig 3.5 è riportato il profilo neuropsicologico di sviluppo ottenuto attraverso i test descritti (Fig. 3.6).

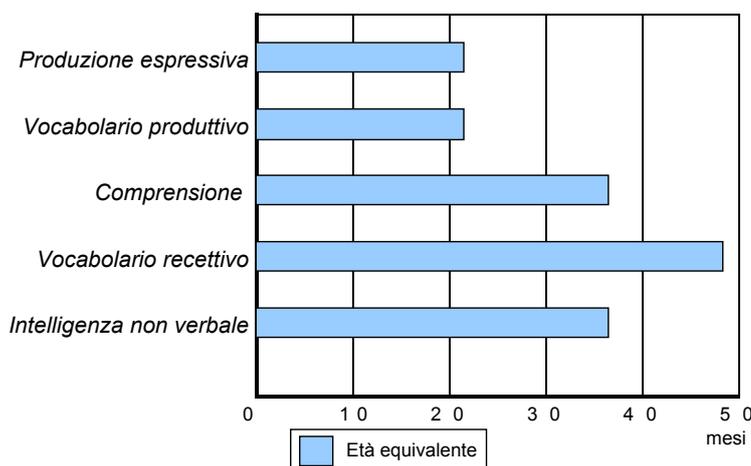


Figura 3.6: *Profilo neuropsicologico di sviluppo del paziente descritto.*

3.2 Ipotesi di trattamento

Nei casi di deficit di CRTR descritti in letteratura la somministrazione di Cr monoidrato per os non ha portato nè ad un miglioramento del quadro clinico nè al ripristino del picco di Cr, rivelandosi per tale motivo inefficace. Il fallimento di tale terapia se da una lato conferma l'impossibilità del passaggio della Cr attraverso la barriera emato-encefalica (BEE), dall'altro lancia una sfida per la ricerca di nuove strategie terapeutiche nell'ipotesi di un pathway di sintesi di Cr a livello cerebrale. In tal caso un possibile trattamento potrebbe essere effettuato con precursori della Cr (Arginina) capaci di attraversare la BEE.

Conclusioni

Il XLMR è una condizione eterogenea che rappresenta il 5-12 % delle cause di RM. Dalla prima definizione del concetto di XLMR grandi passi in avanti sono stati fatti nell'identificazione delle basi molecolari di questo disordine. L'individuazione di numerosi casi clinici caratteristici ha permesso la descrizione di diverse sindromi in cui il RM si associa a numerosi altri sintomi. Le manifestazioni cliniche del XLMR tuttavia sono piuttosto aspecifiche: numerose sono le mutazioni a livello del cromosoma X in cui il RM si associa ad esempio con l'epilessia (AGTR2, SYN1, ATRX, ARX, SMCX) o con assenza del linguaggio (ATRX, SLC16A2) o con comportamento autistico (NLGN3, NLGN4, AGTR2) per cui malgrado i tentativi di definire le singole sindromi, la maggior parte dei pazienti con RM non riceve ancora una diagnosi molecolare per la difficoltà di selezionare i geni da testare in ciascun caso. Un modo per eseguire una diagnosi differenziale potrebbe essere quello di seguire un iter diagnostico che valuti in maniera estensiva il quadro clinico del paziente dagli aspetti anamnestici a quello fenotipo-comportamentali. Le indagini neurochimiche di laboratorio e di spettroscopia in RMN hanno contribuito negli ultimi anni alla definizione di nuovi errori congeniti del metabolismo ed in particolare alla descrizione dei deficit di Cr cerebrale la cui diagnosi è oggi possibile a partire da un dosaggio plasmatico ed urinario della Cr e dei suoi metaboliti fin dai primi giorni di vita. Gli importanti benefici ottenuti dalla supplementazione terapeutica con Cr nei deficit di Sintesi della Cr hanno permesso di identificare la suscettibilità di tali patologie al trattamento sostitutivo mirato rendendo indispensabile la diagnosi precoce, possibilmente

nella fase presintomatica per la prevenzione delle manifestazioni cliniche della malattia. Dalla descrizione del primo caso di deficit del CTRT, numerosi altri pazienti affetti da questa sindrome sono stati riportati e hanno permesso di individuare uno spettro clinico caratterizzato da RM moderato-severo, epilessia trattabile, disturbi del linguaggio e del comportamento e dal punto di vista motorio da una ipotonia centrale associata in alcuni casi a movimenti coreoatetoidi. Il bambino descritto nel nostro studio presenta un deficit del CTRT, diagnosticato grazie all'applicazione del protocollo messo a punto nel nostro Istituto per la valutazione dei disturbi del metabolismo della Cr (Fig. 3.1), con un quadro clinico peculiare caratterizzato da un profilo neuropsicologico con RM medio, disprassia ideomotoria, disturbo del linguaggio con una importante disprassia verbale, un pattern atipico nella sequenza fonemica della sillaba e deficit della programmazione motoria ed esecutiva.

Prospettive future

Potremmo distinguere i possibili obiettivi futuri da raggiungere per entrambi gli argomenti che sono stati oggetto di questa trattazione.

Nell'ambito del XLMR si potrebbe:

- *Identificare caratteri dismorfici, neurologici, comportamentali tipici di ogni sindrome.* La descrizione di caratteristiche tipiche di ogni sindrome può permettere la diagnosi già alla prima osservazione; inoltre la descrizione di sintomi e segni in comune in pazienti considerati affetti da RM non sindromico può portare ad individuare una nuova sindrome.
- *Mettere a punto dei test biochimici o funzionali per valutare direttamente nei pazienti l'attività proteica.* Una possibilità diagnostica potrebbe essere quella di sfruttare le conoscenze delle funzioni dei geni per mettere appunto dei test biochimici o funzionali per valutare direttamente nei pazienti l'attività proteica. Un test di questo tipo è stato messo appunto per valutare l'attività della proteina ACSL4 nei leucociti dei pazienti. Inoltre l'analisi Western blot e kinase assay possono costituire un metodo di pre-screening per individuare pazienti con mutazioni in RPS6KA3; i valori del rapporto Cr/Crn nel plasma e nelle urine possono essere utile per la diagnosi di mutazioni in SLC6A8 infine può essere usata come pre-screening la valutazione dell'attività chinasi della proteina PAK3. L'applicazione di questi quattro test può offrire grandi vantaggi permettendo una diagnosi più rapida e in un maggior numero di pazienti. Attraverso lo studio delle funzioni e dei processi biochimici in cui sono coinvolti gli altri geni responsabili del

XLMR si potrebbero individuare dei test di screening anche per questi casi.

- *Creazione di un network tra i diversi laboratori per lo screening delle mutazioni dei geni del XLMR.* Un accurato esame clinico può talvolta indirizzare verso una corretta analisi molecolare. Tuttavia, per i casi in cui il RM è il solo sintomo presente, non è possibile definire i geni che possono essere più probabilmente mutati, in questi casi sarebbe necessario offrire uno screening di tutti i geni responsabili di XLMR. L'elevato numero di essi, destinato anche ad aumentare nei prossimi anni, rende improbabile che questa analisi globale possa essere effettuata da un singolo laboratorio perchè costosa e perchè richiede molto tempo. Ad oggi, ciascun laboratorio esegue lo screening per le mutazioni di uno o qualche gene del XLMR e di solito su un ridotto numero di pazienti per cui un ampio numero di pazienti non riceve una diagnosi molecolare. Una possibile soluzione di questo problema potrebbe essere la creazione di un network tra più laboratori. In questo modo, ogni laboratorio potrebbe ricercare mutazioni di uno o due geni, riducendo i costi e permettendo l'analisi di un gran numero di pazienti. Chiaramente sarebbe necessario che tutti i laboratori mettessero in comune i risultati delle loro analisi creando un database in cui ogni laboratorio dovrebbe riportarli. Un network di questo tipo richiederebbe un consistente sforzo di tutti i laboratori dal momento che vi è un elevato numero di pazienti in cui non è stata ancora fatta una diagnosi molecolare. Questa organizzazione potrebbe offrire grandi vantaggi oltre che a scopo diagnostico anche per la ricerca. Infatti, data la bassa frequenza delle mutazioni in ciascun gene legato al XLMR, è necessario avere un'ampio numero di pazienti per ricercare una mutazione patogenetica in un nuovo gene potenzialmente causa di XLMR. La creazione di un network di laboratori in grado di scambiarsi pazienti e risultati molecolari, potrebbe fornire una vasta gamma di pazienti in cui sono state escluse le mutazioni dei geni conosciuti come responsabili del XLMR.

Nell'ambito dei deficit primari di Cr potrebbe essere utile:

- condurre studi epidemiologici per stimare l'incidenza dei deficit di Cr e acquisire maggiori conoscenze sul fenotipo clinico;
- effettuare uno screening biochimico neonatale che consenta una diagnosi precoce permettendo un intervento terapeutico tempestivo;
- uno studio di correlazione genotipo-fenotipo;
- mettere a punto un follow-up clinico, neuropsicologico e neurochimico (biochimico e spettroscopico) per monitorare gli effetti della terapia sostitutiva con Cr nei pazienti con deficit di sintesi;
- sviluppare nuove strategie terapeutiche per il trattamento dei casi di deficit di CRTR non responsivi alle terapie finora sperimentate.

Bibliografia

- [1] Penrose L. *A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect*, vol 229. London: HMSO, 1938.
- [2] Lehrke R. *Theory of X-linkage of major intellectual traits*. Am J Mental Defic. **76**, 611-619, 1972.
- [3] Martin J, Bell J. *A pedigree of mental defect showing sex-linkage*. J Neurol Psychiatry. **6**, 154-157, 1943.
- [4] Hunter A. *Creatine and creatinine*. Lougmans Green and Co, 1928.
- [5] Stockler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hanicke W, Frahm J.R. *Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism*. Pediatric Research, **36**, 409-413, 1994.
- [6] Guerrini R, Masi G, Toniolo D. *Ritardo mentale non sindromico*. Malattie genetiche. Piccin 651-662, 2005.
- [7] American Association on Mental Retardation. *Mental Retardation: Definition, Classification, and Systems of Supports*. 10th edn. Washington, 2002.
- [8] WHO. *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders*. Genova: WHO, 1992.

- [9] American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders DSM-IV*. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994
- [10] Stevenson RE, Procopio-Allen AM, Schoer RJ, Collins JS. *Genetics syndromes among individuals with mental retardation*. Am J Med Genet. **123A**, 29-32, 2003.
- [11] Stevenson RE, Schwartz CE, Schroer RJ. *X-linked mental retardation*. New York: Oxford University Press, 2000.
- [12] Ropers HH. *X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder*. Current Opinion in Genetics & Development **16**, 1-10, 2006.
- [13] Stevenson RE, Schwartz CE. *Clinical and molecular contributions to the understanding of X-linked mental retardation*. Cytogenet Genome Res **99**, 265-275, 2002.
- [14] Ropers HH, Hoeltzenbein M, Kalscheuer V, Yntema H, Hamel B, Frynes JP, Chelly J, Partington M, Gecz J, Moraine C. *Nonsyndromic X-linked mental retardation*. Trends Genet **19**, 316-320, 2003.
- [15] Kerr B, Turner G, Mulley J, Gedeon A, Partington M. *Non-specific X linked mental retardation*. J Med Genet **28(6)**, 378-382, 1991.
- [16] Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I. *Non-Syndromic X-Linked Mental Retardation: From a molecular to a clinical point of view*. J Cell Physiol **204**, 8-20, 2005.
- [17] Richards BW, Sylvester PE, Brooker C. *Fragile Xlinked mental retardation: the Martin-Bell syndrome*. J Ment Defic Res **25 Pt 4**, 253-256, 1981.
- [18] Kleefstra T, Hamel BCJ. *X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes*. Clin Genet **67**, 451-467, 2005.

- [19] Ropers HH, Hamel BC. *X-linked mental retardation*. Nat Rev Genet **6**, 46-57, 2005.
- [20] Wattendorf DJ, Muenken M. *Diagnosis and Management of Fragile X Syndrome*. American Family Physician **72**, 111-113, 2005.
- [21] Weaving LS, Ellaway CJ, Gecz J, Christodoulou J. *Rett syndrome: clinical review and genetic update*. J Med Genet **42**, 1-7, 2005.
- [22] Percy A, Lane J. *Rett Syndrome: Model of Neurodevelopmental Disorders*. J Child Neurol **20** (9), 718-722, 2005.
- [23] Orrico A, Lam C, Galli L, Dotti MT, Hayek G, Tong SF, Poon PM, Zappella M, Federico A, Sorrentino V. *MECP2 mutation in male patient with non-specific X-linked mental retardation*. FEBS Lett. **481** (3), 285-288, 2000.
- [24] Budden SS, Dorseyb HC, Steiner RD. *Clinical profile of a male with Rett syndrome*. Brain & Development **27**, 69-71, 2005.
- [25] Huppke P, Gartner J. *Molecular diagnosis of Rett Syndrome*. J Child Neurology **209**, 732-735, 2005.
- [26] Gibbons RJ, Brueton L, Buckle VJ, Burn J, Clayton-Smith J, Davison BC, Gardner RJ, Homfray T, Kearney L, Kingston HM, et al.. *Clinical and hematologic aspects of the X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X)*. Am J Med Genet **55** 288-289, 1995.
- [27] Villard L, Lacombe D, Fontes M. *A point mutation in the XNP gene, associated with an ATR-X phenotype without alphathalassemia*. Eur J Hum Genet **4**, 316-320 , 1996.
- [28] Higgs DR, Vickers MA, Wilki AO, Proterious IM, Jarman AP. *A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster*. Blood **73**, 1081-1104, 1989.

- [29] Gibbons R. *Alpha thalassemia-mental retardation, X linked*. Orphanet Journal of Rare Diseases **1**:15, 2006.
- [30] Guerrini R, Shanahan JL, Carrozzo R, Bonanni P, Higgs DR, Gibbons RJ. *A nonsense mutation of the ATRX gene causing mild mental retardation and epilepsy*. Ann Neurol **47**(1), 117-121, 2000.
- [31] Yang X, Matsuda K et al. *ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology: implication for Coffin-Lowry syndrome*. Cell **117**, 387-396, 2004.
- [32] Hanauer A, Young ID. *Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features*. J Med Genet **39**, 705-713, 2002.
- [33] Merienne K, Jacquot S, Pannetier S, Zeniou M, Bankier A, Gecz J, Mandel JL, Mulley J, Sassone-Corsi P, Hanauer A. *A missense mutation in RPS6KA3 (RSK2) responsabile for non-specific mental retardation*. Nat Genet **22**(1), 13-14, 1999.
- [34] Sherr EH. *The ARX story (epilepsy, mental retardation, autism, and cerebral malformations): one gene leads to many phenotypes*. Current Opinion in Pediatrics. **15**, 567-571, 2003.
- [35] Stromme P, Mangelsdorf ME, Scheffer IE, Gecz J. *Infantile spasms, dystonia, and other X-linked phenotypes caused by mutations in Aristaless related homeobox gene, ARX*. Brain & Development **24**, 266-268, 2002.
- [36] Stromme P, Bakke SJ, Dahl A, Gécz J. *Brain cysts associated with mutation in the Aristaless related homeobox gene, ARX*. J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**, 536-538, 2003.
- [37] Uyanik G, Aigner L, Martin P, GroA C, Neumann D, Marschner-Schäfer H, Hehr U, Winkler J. *ARX mutations in X-linked lissencephaly with abnormal genitalia*. Neurology **61**, 232-235, 2003.

- [38] Philip N, Chabrol B, Lossi A-M, Cardoso C, Guerrini R, Dobyns WB, Raybaud C, Villard L. *Mutations in the oligophrenin-1 gene (OPHN1) cause X linked congenital cerebellar hypoplasia*. J Med Genet **40**, 441-446, 2003.
- [39] Friesema ECH, Grueters A, Biebermann H. *Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation*. Lancet **364**, 1435-1437, 2004.
- [40] Schwartz CE, May MM, Carpenter NJ, Rogers RC, Martin J, Bialer MG, Ward J, Sanabria J, Marsa S, Lewis JA, Echeverri R, Lubs HA, Voeller K, Simensen RJ, Stevenson RE. *Allan-Herndon-Dudley Syndrome and the Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8) Gene*. Am J Hum Genet **77**, 41-53, 2005.
- [41] Stevenson RE. *Advances in X-linked mental retardation*. Curr Opin Pediatr **17**, 720-724, 2005.
- [42] Stevenson RE, Bennett CW, Abidi F et al. *Renpenning syndrome comes into focus*. Am J Med Genet **134 A**, 415-421, 2005.
- [43] Orrico A, Galli L, Cavaliere ML, Garavelli L, Fryns JP, Crushell E, Rinaldi MM, Medeira A, Sorrentino V. *Phenotypic and molecular characterisation of the Aarskog-Scott syndrome: a survey of the clinical variability in light of FGD1 mutation analysis in 46 patients*. European Journal of Human Genetics **12**, 16-23, 2004.
- [44] Jensen LR, Amende M, Gurok U, Tzschach A, Moser B, Janecke A, Tariverdian G, Chelly J, Fryns J-P, van Esch H et al. *Mutations in the JARID1C gene, encoding a protein involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X linked mental retardation* Am J Hum Genet **76**, 227-236, 2005.
- [45] Tzschach A, Lenzner S, Moser B, Reinhardt R, Chelly J, Fryns J-P, Kleefstra T, Raynaud M, Turner G, Ropers HH et al. *No-*

- vel *JARID1C/SMCX* mutations in patients with X-linked mental retardation. *Hum Mutat* **27**, 389, 2006.
- [46] Raymond FL. *X linked mental retardation: a clinical guide*. *J Med Genet* **43**, 193-200, 2006.
- [47] Gregor P, Nash SR, Caron MG, Seldin MF, Warren ST.. *Assignment of the creatine transporter gene (SLC6A8) to human chromosome Xq28 telomeric to G6PD*. *Genomics* **25**, 332, 1995.
- [48] Cecil KM, Salomons GS, Ball WS, Wong B, Chuck G, Nanda M, Jacobs C, deGraw TJ. *Irreversible Brain Creatine Deficiency with Elevated Serum and Urine Creatine: A Creatine Transporter Defect*. *Ann Neurol* **49**, 401-404, 2001.
- [49] Salomons GJ, van Dooren SJM, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, deGraw TJ and Jacobs C. *X-linked creatine transporter (SLC6A8 gene) defect: a new creatine deficiency syndrome*. *Am J Hum Genet*, **68**, 1497-1500, 2001.
- [50] Holtzman D, McFarlane E, Moerland T, Koutcher J, Kushmerick MJ and Neuringer LJ. *Brain creatine phosphate and creatine kinase in mice fed an analogue of creatine*. *Brain Research* **483**, 68-77, 1989.
- [51] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K. *Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis*. *Biochem J* **281**, 21-40, 1992.
- [52] Figura von K, Hanefeld F, Isbrandt D, Stöckler-Ipsiroglu S. *Guanidinoacetate methyltransferase deficiency. The metabolic and molecular basis of inherited disease*. (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D., Eds), New York: McGraw Hill. **8a Ed.**, 1897-1908, 2000.

- [53] Item BC, Stockler-Ipsiroglu S, Stromberger C, Mühl A, Alessandrì MG, Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F, Cioni G. *Arginine:Glycine Amidinotransferase Deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in man*. Am J Hum Genet **69**, 1127-1233, 2001.
- [54] Battini R, Leuzzi V, Carducci Ca, Tosetti M, Bianchi MC, Item C, Stockler S, Cioni G. *Creatine depletion in a new case with AGAT deficiency: clinical and genetic study in a large pedigree*. Mol Gen Metab **77**, 326-331, 2002.
- [55] Battini R, Alessandrì MG, Leuzzi V, Moro F, Tosetti M, Bianchi MC, Cioni G. *Arginine: glicine amidinotransferase (AGAT) deficiency in a newborn: early treatment can prevent phenotypic expression of the disease*. J Pediatr **148**, 828-830, 2006.
- [56] Stockler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hanicke W, Frahm J. *Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism*. Pediatric Research **36**, 409-413, 1994.
- [57] Schulze A, Hess T, Wevers R, Mayatepek E, Bachert P, Marescau B, Knopp M, De Deyn PP, Bremer HJ, Rating D. *Creatine deficiency syndrome caused by guanidinoacetate methyltransferase deficiency: diagnostic tools or a new inborn error of metabolism*. J Pediatr **131**, 626-631, 1997.
- [58] Ganesan V, Johnson A, Connelly A, Eckhardt S, Surtees AH. . *Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: new clinical features*. Pediatr Neurol **17**, 155-157, 1997.
- [59] Leuzzi V, Bianchi MC, Tosetti M, Carducci Cl, Cerquiglini A, Cioni G, Antonozzi I. *Brain creatine depletion: guanidinoacetate methyltransferase deficiency (improving with creatine supplementation)*. Neurology **55**, 1407-1409, 2000.

- [60] Van der Knaap MS, Verhoeven NM, Maaswinkel-Mooij P, Pouwels PJW, Onkenhout W, Peeters EA, Stockler-Ipsiroglu S, Jakobs C. *Mental retardation and behavioural problems as presenting signs in a creatine synthesis defect*. Ann Neurol **47**, 540-543, 2000.
- [61] Struys EA, Jansen EE, Ten brink Hj, Verhoeven NM, van der Knaap MS, Jakobs C. *An accurate stable isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric approach to the diagnosis of guanidinoacetate methyltransferase deficiency*. J Pharm Biomed Anal **18**, 659-665, 1998.
- [62] Carducci Cl, Birarelli M, Leuzzi V, Carducci C, Battini R, Cioni G, Antonozzi I. *Guanidinoacetate and creatine plus creatinina assessment in physiologic fluids: an effective tool for the biochemical diagnosis of arginine:glycine amidinotransferase and guanidinoacetate methyltransferase deficiencies*. Clin Chem **48** (10), 1772-1778, 2002.
- [63] Carducci Ca, Leuzzi V, Carducci Cl, Prudente S, Mercuri L, Antonozzi I. *Two new severe mutations causing guanidinoacetate methyltransferase deficiency*. Mol Genet Metab **71**, 633-638, 2000.
- [64] Greenhaff PL, Casey A, Short AH, Harris R, Soderlund K, Hultman E. *Influence of oral creatine supplementation on muscle torque during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man*. Clin Sci. **84**, 565, 1993.
- [65] Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F, Alessandrì MG, Cipriani P, De Vito G, Canapicchi R. *Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level*. Ann Neurol **47**, 511-513, 2000.
- [66] Stockler S, Marescau B, DeDeyn PP, Trijbels JMF, Hanefeld F. *Guanidino compounds in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a new inborn error of creatine synthesis*. Metabolism **46**, 1189-1193, 1997.

- [67] Schulze A, Mayatepek E, Rating D. *Improved treatment of guanidinoacetato methyltransferase (GAMT) deficiency*. J Inher Metab Dis **23**(1), 211, 2000.
- [68] Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, deGrauw RS, Yntema HG, Bahi N, Moraine C, Ropers H, Fryne J, deGrauw TJ, Jakobs C, Salomons GS. *High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation*. Am J Hum Genet **75**, 97-105, 2004.
- [69] Mandel JL. *Comparative frequency of fragile-X (FMR1) and creatine transporter (SLC6A8) mutations in X-linked mental retardation*. Am J Hum Genet **75**, 730-731, 2004.
- [70] Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, Wood TC, Jakobs C, Stevenson RE, Schwartz CE, Salomons GS. *X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology*. Hum Genet **119**, 604-610, 2006.
- [71] Salomons GJ, van Dooren SJM, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, DeGraw TJ, Jacobs C. *X-linked creatine transporter (SLC6A8 gene) defect: a new creatine deficiency syndrome*. Am J Hum Genet **68**, 1497-1500, 2001.
- [72] deGraw TJ, Cecil KM, Byars AW, Salomons GS, van Dooren SJM, Ball WS, and Jacobs C. *The clinical syndrome of creatine transporter deficiency*. Molecular and cellular Biochemistry **244**, 45-48, 2003.
- [73] deGrauw TJ, Salomons GS, Cecil KM, Chuck G, Newmeyer A, Schpiro MB, Jacobs C. *Congenital Creatine Transporter Deficiency*. Neuropediatrics **33**, 232-238, 2002.
- [74] Pyne-Geithman GJ, deGraw TJ, Cecil KM, Chuck G, Lyons MA, Ishida Y, Clark JF. *Presence of normal creatine in the muscle of a patient with a mutation in the creatine transporter: A case study*. Molecular and cellular Biochemistry **262**, 35-39, 2004.

- [75] Bizzi A, Bugiani M, Salomons GS, Hunneman DH, Moroni I, Estienne M, Danesi U, Jakobs C, Uziel G. *X-linked creatine deficiency syndrome: a novel mutation in creatine transporter gene SLC6A8*. *Ann Neurol* **52(2)**, 227-231, 2002.
- [76] Hahn KA, Salomons GS, Tackels-Horne D, Wood TC, Taylor HA, Schroer RJ, Lubs HA, Jakobs C, Olson RL, Holden KR, Stevenson RE, Schwartz CE. *X-linked mental retardation with seizures and carrier manifestations is caused by a mutation in the creatine-transporter gene (SLC6A8) located in Xq28*. *Am J Hum Genet* **70**, 1349-1356, 2002.
- [77] Kleefstra T, Rosenberg EH, Salomons GS, Stroink H, van Bokhoven H, Hamel BCJ, de Vries BBA. *Progressive intestinal, neurological and psychiatric problems in two adult males with cerebral creatine deficiency caused by an SLC6A8 mutation*. *Clin Genet* **68**, 379-381, 2005.
- [78] Mancini GMS, Catsman-Berrevoets CE, deCoo IFM, Aarsen F, Huijmans JGM, Duran M, van der Knapp MS, Jacobs C, Salomons GC. *A novel splice-site mutation in SLC6A8 causes creatine transporter defect and X-linked mental retardation in a Dutch family*. *Am J Med Genet* **123(3)**, 288-295, 2005.
- [79] Schiaffino MC, Bellini C, Costabello L, Caruso U, Jakobs C, Salomons GS, Bonioli E. *X-linked creatine transporter deficiency. Clinical description of a patient with a novel SLC6A8 gene mutation*. *Neurogenetics*. **6(3)**, 165-168, 2005.
- [80] Kutz MR, Gunter MJ. *Creatine monohydrate supplementation on body weight and percent body fat*. *J Strength Cond Res* **17**, 817-821, 2003.
- [81] Poo-Arguelles P, Arias A, Vilaseca MA, Ribes A, Artuch R, Sans-Fito A, Moreno A, Jakobs C, Salomons G. *X-linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism*. *J Inherit Metab Dis*. **29**, 220-223, 2006.

- [82] Anselm IM, Alkuraya FS, Salomons GS, Jakobs C, Fulton AB, Mazumdar M, Rivkin M, Frye R, Young Poussaint T, Marsden D. *X-linked creatine transporter defect: A report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype*. J Inherit Metab Dis. **29**, 214-219, 2006.
- [83] Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM, Marsden D, Schwartz C, Cecil KM, deGraw TJ, Jacobs C. *X-linked creatine transporter defect: an overview*. J Inherit Metab Dis **26**, 309-318, 2003.

Elenco delle figure

1.1	Disegno schematico del cromosoma X e geni responsabili del XLMR	12
1.2	Funzioni dei geni più importanti coinvolti nel XLMR	13
1.3	Principali sindromi legate al XLMR e loro caratteristiche.	16
1.4	Stadi in cui viene solitamente suddiviso il decorso della forma classica della SR.	21
1.5	Caratteri dismorfici presenti in alcune sindromi legate al XLMR. 34	
1.6	Associazione fenotipo-genotipo del XLMR.	35
1.7	Spettroscopia protonica normale in corrispondenza della sostanza bianca e della sostanza grigia.	36
1.8	Iter diagnostico del XLMR	37
1.9	Algoritmo diagnostico: rapporto fenotipo-genotipo delle sindromi del XLMR descritte.	38
2.1	Sintesi della creatina.	40
2.2	Quadro clinico nei tre pazienti con deficit di AGAT.	42
2.3	RMN cerebrale e RM Spettroscopica della sorella 1 simili a quelle degli altri casi descritti di deficit di AGAT.	44
2.4	Valori plasmatici e urinari di Cr, Crn e GAA dei pazienti con deficit di AGAT e GAMT descritti presso il nostro Istituto.	45
2.5	Mappa delle mutazioni del GAMT.	45
2.6	RM Spettroscopica del cugino all'esordio della malattia e dopo 16 mesi di terapia.	46

2.7	Schema riassuntivo delle caratteristiche cliniche, degli esami biochimici, dei test diagnostici e delle proposte terapeutiche dei deficit di sintesi della Cr.	47
2.8	Sintesi delle caratteristiche cliniche nei pazienti maschi con mutazioni in SLC6A8.	56
2.9	Mutazioni del gene SLC6A8 descritte in letteratura.	57
3.1	Algoritmo diagnostico dei deficit primari di Cr.	63
3.2	Risultati degli esami biochimici nel paziente descritto.	64
3.3	RMN encefalo del paziente descritto.	65
3.4	¹ H-RMS del paziente descritto.	65
3.5	Mutazione genetica del paziente descritto.	66
3.6	Profilo neuropsicologico di sviluppo del paziente descritto. . .	66

Elenco degli acronimi

AAMR	American Association on Mental Retardation
AGAT	Arginina-Glicina Amidinotransferasi
ARX	Aristaless related homeobox gene
BEE	Barriera emato-encefalica
Cho	Colina
CLS	Sindrome di Coffin-Lowry
Cr	Creatina
Crn	Creatinina
CTR1	Trasportatore della creatina
EEG	Elettroencefalogramma
FGD1	Displasia facio-genitale tipo I
FMR1	Fragile Mental Retardation 1
GAA	Acido Guanidinoacetico
GAMT	Guanidinoacetato Metiltransferasi
5HIAA	Acido idrossindolacetico
HPLC	Cromatografia liquida ad alta pressione
HVA	Acido omovanillico
1H-RMS	Spettroscopia Protonica in Risonanza Magnetica
ISSX	X-linked infantile spasms syndrome
JARID1C	Jumonji AT-rich interactive domain 1C
MECP2	Methyl-CpG-binding protein 2
mI	mioinositolo
NAA	n-acetilaspato

NS-XLMR	Ritardo mentale X-linked non sindromico
OPHN1	Oligophrenin 1
PCr	Fosfocreatina
PPM-X	Mental retardation Psychosis Pyramidal signs Macroorchidism
PQBP1	Polyglutamine binding protein 1
QI	Quoziente Intellettivo
QIP	Quoziente Intellettivo di Performance
QIT	Quoziente Intellettivo Totale
QIV	Quoziente Intellettivo Verbale
RM	Ritardo mentale
RMN	Risonanza magnetica nucleare
RPS6KA3	Ribosomal protein S6 Kinase, 90KDa polipeptide 3
SLC16A2	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporter), member 2
SLC6A8	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8
SMCX	Smcy homolog, X-linked (mouse)
SNC	Sistema nervoso centrale
SR	Sindrome di Rett
S-XLMR	Ritardo mentale X-linked sindromico
TC	Tomografia computerizzata
WAIS5	Wechsler Adult Intelligence Scale
WISC-R	Wechsler Intelligence Scale for Children - Revised
WPPSI	Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence
XLAG	X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia
XLMR	Ritardo mentale X-linked

Ringraziamenti

...doverosi ma sinceri! Vorrei per primo ringraziare il proff G. Cioni per avermi dato la possibilità di accostarmi a questo meraviglioso mondo della neuropsichiatria infantile. Ringrazio tutti coloro che sono stati coinvolti, loro malgrado, in questo lavoro di tesi: la dottoressa Battini per la sua guida e per il suo esempio di operosità, la dottoressa Casarano per la sua grande disponibilità e per la sua dolcezza, Leonardo per la sua introduzione e guida all'uso del computer, Filippo per il supporto burocratico. Grazie alla mia famiglia che hanno reso possibile questo mio sogno con non pochi sacrifici. Ringrazio mio padre per la sua compagnia telefonica, mia madre per la fiducia e il suo incoraggiamento anche nei momenti più difficili, mio fratello che, anche se lontano, mi è sempre stato vicino, mio zio Tonino per la sua vitalità ... e per ultima, non per importanza, Patty che con la sua morbidezza mi è stata vicino nei momenti di solitudine e non solo. Grazie ad Antonella e Angelo, compagni di viaggio e di mille avventure. Un capitolo a parte servirebbe per ringraziare Leonardo per aver condiviso con me la tensione prima di ogni esame, le gioie e le tristezze successive; sopportato tutte le mie preoccupazioni e sostenuto in tutti i momenti difficili. Senza di lui questi anni non sarebbero stati così indimenticabili! Grazie anche a tutti i ragazzi che ho conosciuto nella mia lunga carriera universitaria: grazie alle "sardine", Elena e Ada, per la loro spensieratezza e gioia di vivere, alle ragazze del 35 e ai ragazzi del 29 con cui ho condiviso momenti che porterò sempre nel cuore.