

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"AMEDEO AVOGADRO"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

Titolo della tesi

***"Ruolo del trasportatore Glut1 nella Sindrome di De Vivo: approcci
diagnostici, clinici e terapeutici"***

Relatore

Prof. Garavaglia Silvia

Candidata

Bibawy Jessica

Anno Accademico 2022-2023

Sessione straordinaria

Indice

Introduzione

Capitolo 1: La sindrome da deficit di Glut1

1.1 Che cos'è la sindrome da deficit di Glut1

Capitolo 2: Sintomi e Diagnosi

2.1 Sintomi della sindrome da deficit di Glut1

2.2 Diagnosi della sindrome da deficit di Glut1

Capitolo 3: Cause

3.1 La mutazione del gene SLC2A1

3.2 I trasportatori del glucosio

3.3 La proteina trasportatrice Glut1

Capitolo 4: Trattamento della sindrome da deficit di Glut1

4.1 L'importanza della dieta chetogenica

4.2 I problemi legati alla dieta chetogenica

Capitolo 5: Trattamenti all'avanguardia

5.1 Nuovi approcci farmacologici

5.2 Cure sperimentali

Capitolo 6: Complicazioni

6.1 Farmaci e comportamenti da evitare

Conclusioni

Bibliografia

Sitografia

INTRODUZIONE

La sindrome da deficit del trasportatore del glucosio di tipo 1 (Glut1), nota anche come malattia di De Vivo, è una malattia genetica rara che compromette il normale trasporto del glucosio dal sangue al cervello [1]. La malattia è stata scoperta nel 1991 dal medico statunitense Joseph De Vivo, che ha descritto per la prima volta due pazienti affetti da encefalopatia epilettica ad esordio precoce con un ritardo dello sviluppo psicomotorio, microcefalia, mancanza di coordinazione, spasticità e ipoglicorrichia [1]. Il trasporto difettoso del glucosio attraverso la barriera ematoencefalica è stato ipotizzato sulla base dei risultati ottenuti dalla misurazione della concentrazione di glucosio e lattato, ossia concentrazioni basse nel liquido spinale, ma con valori normali di glucosio nel siero [1]. L'ipotesi venne confermata dalle successive indagini genetiche che evidenziarono mutazioni a carico della sequenza del gene *SLC2A1*. De Vivo trattò i propri pazienti con una dieta chetogenica, un regime alimentare che induce il corpo a produrre chetoni, ovvero una fonte di energia alternativa al glucosio per il sistema nervoso centrale [2]. La dieta chetogenica ha dimostrato di essere efficace nel migliorare i sintomi causati dalla mancanza di glucosio a livello del Liquor, tra cui convulsioni, disabilità cognitive e problemi di movimento [2].

La sindrome da deficit di Glut1 è una malattia rara, i dati epidemiologici evidenziano la malattia in 1 paziente ogni 80.000 nati vivi [3]. Tuttavia, le crescenti segnalazioni di casi considerati "atipici" e la scoperta che più dell'1% delle persone affette da epilessia "idiopatica" presenta una mutazione confermata nel gene *SLC2A1* suggeriscono che l'incidenza della sindrome da carenza di Glut1 potrebbe essere più elevata [3]. Infatti, diversi dati indicano che questa condizione sembra essere sotto-diagnosticata a causa della scarsa consapevolezza a riguardo, della difficoltà nella diagnosi che prevede un esame invasivo come il prelievo del Liquor con stime che suggeriscono una prevalenza fino a 1 caso su 25.000 persone [3]. Non è inoltre nota alcuna suscettibilità correlata al sesso o alla razza [3].

CAPITOLO 1

LA SINDROME DA DEFICIT DI GLUT1

1.1 Che cos'è la sindrome da deficit di Glut1?

La sindrome da deficit del Glucose transporter 1 (Glut1) è una sindrome causata da un alterato trasporto del glucosio attraverso le barriere del tessuto cerebrale. In generale la diffusione del glucosio attraverso le barriere tissutali è facilitata da una famiglia di proteine (Glut), che include il trasportatore Glut1, ubiquitariamente distribuite ma con una specificità di organo [4]. Infatti, il Glut1 è principalmente espresso negli eritrociti e nelle barriere ematoencefaliche, mentre il Glut2 si trova principalmente nel fegato, nel pancreas e nell'intestino tenue [4]. Il Glut3 è localizzato nei neuroni, mentre il Glut4 è presente negli adipociti, nei muscoli e nel cuore [4]. Allo stesso modo i Glut5, Glut7, Glut8 e Glut14 sono principalmente distribuiti nel testicolo e nell'intestino, mentre Glut9 è presente nel fegato e nel rene [4]. Il Glut11 si trova nel pancreas, nei reni, nella placenta e nei muscoli, mentre il Glut6 è espresso nel cervello e nella milza [4]. Il Glut10 è localizzato nel fegato e nel pancreas, mentre il Glut12 è presente nel cuore e nella prostata [4]. Il glucosio è il combustibile metabolico essenziale per il cervello, di conseguenza un difetto genetico di Glut1 compromette il trasporto del glucosio attraverso la barriera ematoencefalica e negli astrociti, provocando una "crisi energetica cerebrale" denominata sindrome da deficit del trasportatore di glucosio di tipo 1 [5]. I sintomi generalmente si sviluppano entro i primi mesi di vita e possono includere convulsioni ricorrenti resistenti ai farmaci e movimenti oculari involontari [5], altri sintomi includono microcefalia, ovvero dimensioni della testa insolitamente piccole, che si sviluppa dopo la nascita, ritardo dello sviluppo, disabilità intellettiva e altri problemi neurologici come spasticità, difficoltà di coordinazione dei movimenti e disartria [5]. La sindrome da deficit di Glut1 è causata da alterazioni del gene *SLC2A1*, che codifica per la proteina trasportatrice Glut1 ed è ereditaria con modalità autosomica dominante [5]. Il dosaggio del glucosio nel Liquor e l'analisi genetica di *SLC2A1* rimangono i fondamentali metodi per la diagnosi [5]. Non esiste una cura per la carenza di Glut1, quindi il trattamento è mirato a gestire i sintomi e in aggiunta si tratta di una malattia cronica che richiede una gestione a lungo termine. In generale dopo il trattamento appropriato, molte persone possono vedere un miglioramento dei sintomi e una migliore qualità di vita, ma non risolvono la malattia. I corpi chetonici sono l'unica fonte energetica alternativa e che può sostituire il glucosio come metabolita a livello

dell'encefalo [5]. Il trattamento, quindi, consiste nel far iniziare al paziente una dieta chetogenica, ovvero una dieta ricca di grassi, moderata di proteine e povera/nulla di carboidrati con conseguente effetto neuroprotettivo e di antiepilettogenesi [5]. Questo tipo di regime alimentare risulta essere difficile da preparare e altrettanto difficile da rispettare da parte del paziente. Nonostante l'efficacia della dieta chetogenica, nella sindrome da deficit di Glut1 emerge la necessità di terapie aggiunte e nuovi approcci.

CAPITOLO 2

SINTOMI E DIAGNOSI

2.1 Sintomi della sindrome da deficit di Glut1

I sintomi caratteristici della sindrome da deficit di Glut1 sono di seguito elencati:

- convulsioni
- un disturbo motorio complesso
- ritardo dello sviluppo
- disabilità intellettiva
- disturbi della parola e del linguaggio [6].

Nei primi articoli pubblicati sul deficit di Glut1, le crisi epilettiche erano considerate obbligatorie per formulare la diagnosi [6]. Negli ultimi anni, tuttavia, sono stati segnalati diversi pazienti senza crisi epilettiche e con soli disturbi del movimento e ritardo mentale, nonché pazienti che sembrano avere uno sviluppo neuro-motorio simile alle persone sane [6]. I sintomi di questa malattia possono iniziare a manifestarsi nei neonati, dal momento della nascita fino a 4 settimane di età e nei bambini, dal 1° mese fino al ventitreesimo [6]. Il decorso della gravidanza e del parto risultano solitamente normali ed inoltre la pubertà porta spesso alla variazione dei sintomi [6].

Nel dettaglio, classificando i sintomi in base alla loro frequenza, tra quelli che si sviluppano molto frequentemente si possono individuare:

- *epilessia*; le convulsioni farmacoresistenti sono spesso il primo segno di deficit di Glut1 [7]. È possibile osservare qualsiasi tipo di convulsione, le crisi generalizzate sono più frequenti delle crisi focali [7]. L'epilessia tende ad essere il principale problema clinico nei neonati e nei bambini piccoli affetti da deficit di Glut1, mentre le crisi epilettiche tendono a diminuire o a scomparire nella tarda infanzia, nell'adolescenza e nell'età adulta [7];
- *morfologia anormale degli eritrociti* intesa qualsiasi anomalia strutturale dei globuli rossi [7];
- *atassia*; nello specifico l'atassia cerebellare si riferisce all'atassia dovuta alla disfunzione del cervelletto [8]. Ciò causa una serie di deficit neurologici elementari tra cui asinerzia, mancanza di coordinazione tra muscoli, arti e articolazioni, dismetria

mancanza di capacità di valutare le distanze, e disdiadococinesia, incapacità di eseguire movimenti rapidi [8];

- *distonia*, responsabile di contrazioni e spasmi muscolari involontari. Si potrebbe presentare un tono muscolare aumentato in modo anomalo che può portare a posture scomode e contorte, e a movimenti di torsione lenti e intermittenti [8];
- *encefalopatia* con danno o malfunzionamento del cervello che in generale si manifesta con uno stato mentale alterato [8];
- *ritardo globale dello sviluppo*; nello specifico un ritardo nel raggiungimento di traguardi motori o mentali negli ambiti dello sviluppo del bambino, comprese le abilità motorie, la parola e il linguaggio, le abilità cognitive e le abilità sociali ed emotive [8];
- *ipoglicorrichia* ossia concentrazione di glucosio anormalmente bassa nel liquido cerebrospinale [8];
- *microcefalia progressiva* che viene diagnosticata quando la circonferenza della testa scende progressivamente al di sotto delle norme dipendenti dall'età e dal sesso [8];
- *spasticità* o disturbo motorio caratterizzato da un aumento del tono muscolare che porta a una rigidità e a contrazioni muscolari involontarie [8];
- *stato epilettico*; è un tipo di crisi epilettica prolungata, una condizione che può avere conseguenze a lungo termine, tra cui morte neuronale, danno neuronale e alterazione delle reti neuronali, a seconda del tipo e della durata delle crisi [8].

Tra i sintomi frequenti possiamo elencare:

- *corea*: sintomo che si riferisce a movimenti involontari anormali dei muscoli del corpo. È caratterizzato da una serie di movimenti rapidi, irregolari e non ritmici [9] che possono coinvolgere una singola parte del corpo o essere diffusi, coinvolgendo diverse parti del corpo contemporaneamente [9];
- *coreoatetosi* ossia movimenti involontari caratterizzati sia da atetosi, incapacità di sostenere i muscoli in una posizione fissa, e sia da corea [9];
- *confusione*: mancanza di chiarezza e coerenza di pensiero, percezione, comprensione o azione [10];
- *cianosi*: colorazione bluastra o violacea della pelle, delle mucose o delle unghie dovuta ad una cattiva circolazione o inadeguata ossigenazione del sangue arterioso o capillare [10];

- *ritardo nello sviluppo della parola e del linguaggio*. Nei pazienti si registra un grado di sviluppo del linguaggio significativamente inferiore alla norma per un bambino di una determinata età [10];
- *disartria*: il linguaggio disartrico è una descrizione generale che si riferisce a un disturbo neurologico del linguaggio caratterizzato da una scarsa articolazione e pronuncia delle parole in modo chiaro e fluente [10]. A seconda delle strutture neurologiche coinvolte, la disartria può essere ulteriormente classificata come spastica, flaccida, atassica, ipercinetica, ipocinetica o mista [10];
- *discinesia*: un disturbo del movimento che consiste nella diminuzione dei movimenti volontari e la presenza di movimenti involontari [10]. Questi movimenti possono riguardare diverse parti del corpo, come braccia, gambe, testa, collo e altre regioni [10]. La discinesia può manifestarsi in diversi modi, tra cui torsioni, tremori, movimenti ondulatori, scatti e altri movimenti irregolari [10];
- *mal di testa* sintomo è comune e può variare notevolmente in intensità e durata [10];
- *emiparesi* con perdita di forza nel braccio, nella gamba e talvolta nel viso su un lato del corpo [10]. L'emiplegia si riferisce ad una completa perdita di forza, mentre l'emiparesi di riferisce ad una perdita incompleta di forza o della capacità di movimento in metà del corpo, che può riguardare sia il lato destro e sia il sinistro [10];
- *ipertonia* ossia una condizione in cui vi è un aumento del tono muscolare tale che le braccia o le gambe, ad esempio, sono rigide e difficili da muovere [10];
- *disabilità intellettuale*. Funzionamento intellettuale subnormale che ha origine durante il periodo dello sviluppo [10]. La disabilità intellettiva, precedentemente denominata "ritardo mentale", è stata definita come un punteggio di QI generalmente inferiore a 70 [10]. Questa condizione di manifesta durante l'infanzia o l'adolescenza e persiste in età adulta [10];
- *letargia*, uno stato di disinteresse, svogliatezza, indifferenza e affaticamento estremo, che comporta difficoltà nell'esecuzione di compiti semplici o nella concentrazione e una marcata mancanza di energia [10];
- *rigidità muscolare*, una condizione in cui i muscoli del corpo diventano tesi, contratti e difficili da rilassare [11]. Questo stato di tensione può variare da lieve a grave, può essere doloroso e limitare il movimento [11];
- *paralisi* dei muscoli volontari significa perdita di contrazione dovuta all'interruzione di una o più vie motorie dal cervello alle fibre muscolari [11]. Sebbene la parola paralisi

sia spesso usata in modo intercambiabile per indicare la perdita completa o parziale della forza muscolare. La paralisi motoria deriva da deficit dei motoneuroni superiori corticospinali, corticobulbari o sottocorticospinali. [11]. La paralisi motoria è spesso accompagnata da una compromissione della facilità di movimento [11];

- *movimenti oculari parossistici involontari* con episodi a esordio improvviso di movimenti oculari anormali e involontari [11].

Infine, si distinguono i sintomi che si manifestano occasionalmente:

- *aprassia*, un difetto nella comprensione di comandi motori complessi e nell'esecuzione di alcuni movimenti appresi [10]. Le persone con aprassia hanno difficoltà a pianificare e coordinare i movimenti necessari per svolgere azioni specifiche, come parlare, scrivere, vestirsi o utilizzare utensili [10];
- *apnea centrale* derivante dalla depressione dei centri respiratori nel midollo allungato [10];
- *mioclono*, contrazioni muscolari casuali molto brevi e involontarie che si verificano a riposo, in risposta a stimoli sensoriali o che accompagnano movimenti volontari [11]. Questi movimenti muscolari possono manifestarsi in diverse parti del corpo ed essere di varia intensità [11];
- *disturbi del sonno*. Questi sono una categoria di condizioni mediche che influenzano negativamente la qualità, la durata o il ritmo del sonno di una persona [10]. Un'anomalia del sonno che comprende fenomeni come insonnia o ipersonnia, disturbo del ritmo del sonno, apnea notturna e irrequietezza [10];
- *strabismo* ossia un disturbo oculare in cui gli occhi non sono allineati correttamente e puntano in direzioni diverse [10]. In condizioni normali, entrambi gli occhi dovrebbero essere rivolti nella stessa direzione e focalizzati sullo stesso punto [10];
- *parkinsonismo* definito come un insieme di sintomi e segni simili a quelli manifestati nella malattia del Parkinson, ma che possono essere causati da condizioni diverse [11].

Non tutti i pazienti manifestano tutti i sintomi e vi è una considerevole variabilità sia nella combinazione e sia nella gravità dei sintomi da un paziente all'altro [10]. La sintomatologia di un paziente può essere influenzata dall'assunzione di cibo, con una tendenza al peggioramento durante la fame, soprattutto prima dei pasti, durante i periodi di digiuno e appena dopo essersi svegliati al mattino [10]. Dopo l'assunzione di cibo si possono notare miglioramenti temporanei. Inoltre, i sintomi possono essere aggravati o scatenati da altri fattori come la

stanchezza, l'ambiente caldo, l'ansia e lo stato di salute [10]. I sintomi e la risposta al trattamento possono cambiare nel tempo, in particolare durante la fase di crescita e sviluppo nell'adolescenza e nell'età adulta [10]. Alcuni sintomi possono essere costanti come le difficoltà cognitive e motorie, altri saltuari come ad esempio le crisi epilettiche e il mal di testa [10].

2.2 Diagnosi della sindrome da deficit di Glut1

La diagnosi della sindrome da deficit di Glut1 si basa sulla combinazione dei sintomi clinici citati precedentemente, sull'analisi genetica di *SLC2A1* e sulla valutazione della glicorrachia [12]. In alcuni casi, la diagnosi di deficit di Glut1 può essere difficile da stabilire e i pazienti vengono sottoposti ad altri test diagnostici, come l'elettroencefalografia (EEG), la risonanza magnetica (RM) e la tomografia computerizzata (TC) [12]. La sindrome da deficit del trasportatore del glucosio di tipo 1 (Glut1 DS) dovrebbe essere considerata come una possibile diagnosi in individui che presentano uno dei due principali fenotipi [12]. Nel fenotipo classico, che coinvolge circa il 90% dei soggetti affetti, le convulsioni solitamente iniziano prima dei due anni di età, tra 1 e 6 mesi [12]. Oltre alle convulsioni, questi pazienti mostrano ritardo nello sviluppo neurologico, disartria, microcefalia acquisita e disturbi del movimento complessi, come atassia, distonia e corea [12]. D'altra parte, nel fenotipo non classico, che interessa circa il 10% degli individui affetti, le convulsioni non sono presenti [12]. Si tratta di una forma più lieve della sindrome, caratterizzata da frequenti episodi di discinesie parossistiche, tra cui atassia intermittente, coreoatetosi, distonia ed emiplegia alternante [12].

La puntura lombare è un'indagine cruciale per diagnosticare la sindrome da deficit di Glut1, in quanto rileva la presenza di bassi livelli di glucosio nel liquido cerebrospinale in un contesto di normo-glicemia [13]. Questa condizione, chiamata ipoglicorrichia, rappresenta il segno metabolico distintivo della sindrome da deficit di Glut1 [13]. Prima di effettuare la puntura lombare i pazienti sono tenuti a digiunare per un periodo di 4-6 ore al fine di stabilizzare i livelli di glucosio nel compartimento cerebrospinale [13]. La misurazione della glicemia dovrebbe essere determinata immediatamente prima della puntura lombare per evitare un'iperglicemia correlata allo stress [13]. Gli intervalli di riferimento sono indipendenti dal genere, ma specifici per età [13]. L'ipoglicorrichia nella tipica sindrome da deficit di Glut1 era originariamente definita con un valore limite di 2,2 mmol/l (40 mg/dl) [14]. Tuttavia, è emerso che i fenotipi più lievi possono presentare livelli di glucosio nel liquido cerebrospinale compresi tra 2,2 e 2,9 mmol/l (41-52 mg/dl), ma mai valori normali [14]. È importante notare

che il livello di lattato nel liquido cerebrospinale non è mai elevato nella sindrome da deficit di Glut1, ma rimane costantemente basso [14]. Inoltre, il rapporto tra glucosio nel liquido cerebrospinale e concentrazione di glucosio nel sangue può essere un biomarcatore aggiuntivo e dovrebbe essere $< 0,45$ nelle persone affette da deficit di Glut1, tuttavia, questo valore è meno affidabile del valore assoluto del glucosio nel liquido cerebrospinale [14]. Una volta esclusa l'ipoglicemia e la meningite è probabile che la diagnosi sia la sindrome da deficit di Glut1 [14]. Nei pazienti che seguono una dieta chetogenica che hanno il sospetto di essere affetti dalla sindrome da deficit di Glut1, la puntura lombare continua ad essere uno strumento diagnostico valido, la quale mostrerà ipoglicorrichia [14]. Affidarsi solamente all'ipoglicorrichia potrebbe però non essere utile per una diagnosi definitiva nei singoli casi [14]. Di conseguenza, l'analisi molecolare del gene *SLC2A1* è diventata il gold standard alternativo nella diagnosi della sindrome da deficit di Glut1 [15]. Gli approcci ai test genetici molecolari possono includere test su un singolo gene, l'uso di un pannello multigenico e test genomici più completi [15]. L'analisi della sequenza identifica varianti patogene eterozigoti in *SLC2A1* nell'81-89% dei pazienti [15]. Un altro 11-14% dei pazienti è confermato dall'analisi delle delezioni o duplicazioni [15]. Finora sono state diagnosticate più di 150 mutazioni nel gene *SLC2A1* che sottendono al malfunzionamento del trasportatore causando la sindrome di De vivo [15]. I pazienti *SLC2A1* negativi possono essere diagnosticati sulla base dell'ipoglicorrichia e delle caratteristiche cliniche distintive, soprattutto quando rispondono favorevolmente alla dieta chetogenica [15]. Tuttavia, l'assenza di varianti patogene *SLC2A1* non sempre esclude la sindrome da deficit di Glut1 [15]. Se i test genetici molecolari non riescono a rilevare una variante patogena di *SLC2A1*, è possibile eseguire il test di assorbimento del glucosio negli eritrociti [16]. Un dosaggio anormalmente basso implica un'anomalia in *SLC2A1* [16]. Il test di assorbimento del 3-O-metil-D-glucosio negli eritrociti è una misura funzionale del trasporto del glucosio attraverso la membrana cellulare del globulo rosso [16]. Nei soggetti affetti da sindrome da deficit di Glut1 di tutte le età, un elettroencefalogramma interictale ovvero il registro dell'attività cerebrale effettuato in momenti in cui il paziente non sta sperimentando un attacco epilettico, è spesso normale [16]. D'altra parte, la morfologia delle forme d'onda EEG registrate al momento di una crisi sono abbastanza caratteristiche e possono mostrare attività focale a onde lente, picchi di alta tensione o schemi di picchi e onde [17]. Le anomalie appaiono più comuni a determinate età, nei neonati il rallentamento focale e le scariche epilettiformi sono più prevalenti. In conclusione, si verificano casi in cui vi è una riduzione dell'attività elettrica in specifiche aree del cervello, evidenziata da onde cerebrali più lente o

anomale e casi di scariche caratterizzate da picchi e onde elettroencefalografiche anormali [17]. Nei bambini di età pari o superiore a due anni si osserva uno schema generalizzato di onde a punta da 2,5 a 4 Hz [17]. Una caratteristica interessante, quando presente, è l'anomalia rilevata tramite l'elettroencefalogramma nel periodo pre-prandiale che migliora con l'alimentazione man mano che il glucosio viene ripristinato in un cervello affamato nelle persone sane. [17] La maggior parte dei pazienti con la sindrome da deficit di Glut1 risponde bene all'introduzione della dieta chetogenica con una pronta e continua cessazione delle crisi a sostegno della diagnosi [17]. La dieta chetogenica dovrebbe essere iniziata immediatamente se si sospetta la presenza della malattia per intervenire immediatamente sulla clinica e compensare la mancanza di ATP dovuta all'ipoglicorrichia. L'imaging radiologico viene utilizzato per valutare il tessuto cerebrale ed escludere malattie diverse da GLUT1-DS, che potrebbero anche indurre l'epilessia nei bambini [17]. Studi su popolazioni di grandi dimensioni hanno mostrato modelli caratteristici per GLUT1-DS nella risonanza magnetica e nella tomografia a emissione di positroni (PET) del cervello [17]. Questi studi sono di enorme importanza per la diagnosi soprattutto perché la procedura della puntura lombare è un esame invasivo e i tempi di attesa per ottenere i risultati del test genetico possono variare da due a tre mesi [18]. In aggiunta all'imaging per accelerare la diagnosi è stato messo a punto un nuovo test diagnostico noto come METAGlut1 [18]. Questo innovativo approccio consente di ottenere i risultati in soli due giorni attraverso un semplice prelievo di sangue. Inoltre, il test ha dimostrato di essere altamente sensibile, con un tasso di precisione del 70%, e altamente specifico, con una specificità del 99% [18]. Metafora Biosystems è l'azienda con sede in Francia impegnata nello sviluppo di METAGlut1, progettato per diagnosticare la carenza di Glut1 attraverso il rilevamento di anomalie energetiche cellulari e che ha ricevuto il marchio CE per facilitare l'implementazione nei laboratori di analisi di routine [18]. Questo test si basa sulla quantificazione di GLUT1 sulla superficie degli eritrociti, fornisce quindi la marcatura diretta dei globuli rossi freschi mediante la citometria a flusso e un software per il calcolo automatizzato [18]. È richiesto un semplice prelievo di sangue in una provetta EDTA e non è necessario che il paziente digiuni prima. Una riduzione di oltre il 24% di GLUT1 sulla superficie dei globuli rossi rappresenta un marker distintivo della sindrome da deficit di GLUT1 [18]. Attualmente, il test è accessibile in Francia, Belgio e Lussemburgo e sono in corso ulteriori sforzi di ricerca e sviluppo con l'obiettivo di renderlo disponibile in molto più paesi [18].

La diagnosi differenziale della sindrome da deficit del trasportatore del glucosio di tipo 1 (Glut1 DS) è un processo che consiste nel confrontare i sintomi e i segni del paziente con altre possibili condizioni mediche che potrebbero avere manifestazioni simili [6]. Questo processo aiuta i medici a identificare in modo accurato la Glut1 DS, distinguendola da altre malattie o disturbi. La diagnosi differenziale di Glut1DS comprende diverse condizioni, tra cui:

- altre cause di neuroglicopenia, in riferimento riferisce ad altre condizioni mediche che possono causare una bassa concentrazione di glucosio nel cervello, comprese situazioni di ipoglicemia cronica o intermittente [6]. Per esempio, l'iperinsulinismo familiare, una condizione in cui il pancreas produce e rilascia troppa insulina, causando ipoglicemia [6];
- convulsioni neonatali e di microcefalia acquisita. La diagnosi differenziale si concentra anche su tutte le possibili cause di convulsioni che si verificano nei neonati; in aggiunta deve escludere la microcefalia acquisita, che è una riduzione anomala delle dimensioni del cranio [6]. Questo è importante poiché alcuni sintomi della Glut1 DS, come le convulsioni, possono essere riscontrati in altre condizioni;
- manifestazioni precoci della sindrome di Rett e della sindrome di Angelman. Questo processo riguarda l'analisi dei sintomi che potrebbero essere simili a quelli della Glut1DS nelle fasi iniziali delle sindromi di Rett e Angelman [6];
- altre condizioni in cui la diagnosi differenziale include anche disturbi del movimento come la distonia e disturbi neurologici parossistici che rispondono o possono essere prevenuti dall'assunzione di carboidrati [6]. Questi sintomi possono essere simili a quelli della Glut1 DS.

La conferma diagnostica è fondamentale per avviare un trattamento adeguato e mirato.

CAPITOLO 3

LE CAUSE DELLA SINDROME

3.1 La mutazione del gene SLC2A1

La sindrome Glut1DS è una malattia genetica rara. Il DNA risiede nel nucleo di una cellula e, nell'essere umano, è organizzato in 23 coppie di cromosomi [19]. Ciascun gene svolge una funzione specifica nelle nostre cellule. Alcuni geni codificano la produzione di proteine, le quali sono essenziali per la struttura, la funzione e la regolazione delle cellule, dei tessuti e degli organi del corpo [19]. Una variante genetica è una modificazione nel codice di un gene o nella sequenza del DNA che rende il gene diverso da quello presente nella maggior parte delle persone. Una variante benigna non provoca problemi di salute [19]. Al contrario, una variante patogena causa problemi di salute o malattie in quanto altera il funzionamento del gene. A volte, una variante patogena può essere denominata mutazione o variante patogenetica [19]. Le varianti denominate mutazioni germinali che si verificano negli ovuli o negli spermatozoi possono essere ereditate dalla prole, mentre le mutazioni somatiche presenti in altre cellule non vengono trasmesse [19]. La sindrome da deficit di Glut1 è causata da mutazioni nel gene *SLC2A1* [19] che possono essere ereditate con modalità autosomica dominante [19]. "Autosomico" indica che il gene si trova su qualsiasi cromosoma, ad eccezione dei cromosomi sessuali X e Y [6]. Di solito, i geni si presentano in coppia, e "dominante" significa che basta solo una copia del gene responsabile, detto gene causale, presenta una mutazione affinché una persona manifesti la malattia [6]. Ogni figlio di un individuo affetto da una malattia autosomica dominante ha una probabilità del 50% di ereditare la variante e quindi la malattia. In genere, i bambini che ereditano una variante dominante contrarranno la malattia, ma la gravità dei sintomi può variare rispetto ai loro genitori [6]. In alcuni casi, una persona può portare una variante patogena di una malattia autosomica dominante senza mostrare segni o sintomi della malattia [6]. In rari casi, la sindrome da deficit di Glut1 può essere ereditata con modalità autosomica recessiva, il che significa che il soggetto malato avrà ricevuto una copia mutata del gene da ciascun genitore [19]. La maggior parte delle mutazioni rilevate nel gene *SLC2A1* si verificano come "*de novo*", il che significa che la malattia si manifesta a causa di una nuova variante patogena che compare spontaneamente nel gene causale e non ha alcuna correlazione con una storia familiare della malattia [19]. Tutte le mutazioni rilevate sono eterozigoti, poiché si ritiene che le mutazioni omozigoti del gene *GLUT1* o *SLC2A1* siano letali

in utero [19]. Con "eterozigoti" si intende una situazione in cui un organismo possiede due copie diverse di un gene specifico nel proprio genoma. Una delle copie del gene presenta la mutazione, mentre l'altra è nella sua forma normale [19]. La sindrome da deficit di Glut1 si verifica quando, a causa di una modifica nel gene *SLC2A1*, la quantità di proteina GLUT1 non è sufficiente per garantire un adeguato apporto di glucosio al sistema nervoso centrale, con conseguente compromissione della funzione e dello sviluppo neurologico [19]. La gravità della condizione clinica è inversamente proporzionale all'attività residua della proteina GLUT1, e un'attività inferiore al 25% è incompatibile con la vita [19]. Il gene *SLC2A1* si trova sul braccio corto del cromosoma 1 ed è costituito da 10 esoni con una lunghezza complessiva di 35 kb [19]. Le mutazioni nel gene *SLC2A1* rappresentano la causa della sindrome da deficit di Glut1, e queste varianti si trovano in diverse regioni del gene, con alcune zone più colpite di altre. Circa il 90% delle varianti riscontrate nei pazienti affetti dalla sindrome da deficit di Glut1 coinvolge una o poche coppie di basi del gene *SLC2A1*. Più raramente, sono stati segnalati casi in cui si verificano ampie delezioni o duplicazioni, che possono coinvolgere l'intero gene [20]. Le mutazioni del gene *SLC2A1* possono essere suddivise in diverse categorie:

- *mutazioni puntiformi*: queste mutazioni coinvolgono la sostituzione di singoli nucleotidi all'interno del gene [20]. Questo tipo di mutazione può portare a un cambiamento specifico nella sequenza di amminoacidi della proteina Glut1, influenzando la sua funzione;
- *delezioni e inserzioni*: alcune mutazioni possono comportare l'eliminazione o l'inserzione di uno o più nucleotidi nel gene *SLC2A1* [20]. Queste mutazioni possono causare uno spostamento del "frame di lettura" del gene, portando alla produzione di una proteina non funzionale.
- *splicing anomalo*: altre mutazioni possono influenzare il processo di splicing, che è coinvolto nella maturazione dell'RNA messaggero (mRNA). Questo può portare alla produzione di una proteina Glut1 con una struttura anormale [20].

Nei pazienti con mutazioni missenso, ovvero mutazioni genetiche che causano la sostituzione di un singolo nucleotide nel DNA, portando a una modifica nella sequenza di amminoacidi di una proteina, solitamente si riscontrano sintomi da moderati a lievi [20]. Tuttavia, non è stata stabilita una chiara correlazione tra il fenotipo e di conseguenza la manifestazione clinica con il genotipo, la mutazione specifica [20]. Infatti, i pazienti che condividono mutazioni identiche spesso non presentano manifestazioni cliniche identiche [20]. Questo suggerisce che vi siano ulteriori meccanismi coinvolti, come altri geni e/o proteine che possono modificare la malattia,

influenzando il fenotipo e potenzialmente contribuendo alla complessa fisiopatologia di questa condizione [20].

3.2 La famiglia dei trasportatori GLUT

Il trasporto di monosaccaridi, polioli e altri piccoli composti del carbonio attraverso le membrane delle cellule eucariotiche è mediato dai membri della famiglia Glut, proteine codificate dai geni *SLC2* [21]. Questa famiglia comprende 14 proteine umane Glut, ognuna con specificità di substrato variabile, coinvolte nel trasporto di numerosi esosi oltre a urato, glucosamina e ascorbato [21]. Le proteine Glut sono costituite da circa 500 residui di amminoacidi e possono essere classificate in 3 classi in base alla somiglianza delle sequenze e all'affinità per i substrati [21]. I Glut di classe I (Glut 1, 2, 3, 4, 14) facilitano l'assorbimento del glucosio e di altri esosi, ma non del fruttosio [21]. I Glut di classe II (glut 5, 7, 9, 11) sono trasportatori di fruttosio, mentre i Glut di classe III (6, 8, 10, 12, HMIT) sono membri strutturalmente atipici [21] (Tabella 1).

	Tessuti di espressione	Substrati principali	
GLUT1	Eritrociti, barriere emato-tissutali	Glucosio, 2-DG	Classe I
GLUT2	Fegato, pancreas, intestino tenue	Glucosio, Glucosamina	
GLUT3	Neuroni	Glucosio, 2-DG	
GLUT4	Adipociti, muscolo, cuore	Glucosio, Glucosamina	
GLUT14	Testicolo	Sconosciuto	
GLUT5	Testicolo, intestino, muscolo	Fruttosio	Classe II
GLUT7	Testicolo, intestino, prostata	Fruttosio, glucosio	
GLUT9	Fegato rene	Urato	
GLUT11	Pancreas, reni, placenta, muscoli	Fruttosio, glucosio	
GLUT6	Cervello, milza, leucociti	Glucosio	Classe III
GLUT8	Testicolo, neuroni, adipociti	Glucosio, trealosio	
GLUT10	Fegato, pancreas	2-DG	
GLUT12	Cuore, prostata	Glucosio	

Tabella 1 – Classificazione, espressione e preferenza di substrato dei 14 GLUT conosciuti. Fonte: [22]

Classe I dei trasportatori Glut.

Glut1: è stato il primo membro della famiglia Glut ad essere identificato ed è ampiamente distribuito in tutti i tessuti del corpo [22]. La sua principale funzione è trasportare il glucosio attraverso la barriera ematoencefalica [22]. Oltre al glucosio, Glut1 è noto per trasportare anche il galattosio, il mannosio e la glucosamina [22]. È importante notare che Glut1 è spesso sovraespresso in vari tipi di tumori, tra cui quelli del cervello, della mammella, della cervice, del colon, del rene, del polmone, dell'ovaio, della prostata, della pelle e della tiroide [22]. Al contrario, il deficit di Glut1 è associato alla sindrome di De Vivo [22].

Glut2: questo trasportatore mostra una somiglianza di sequenza del 55% con Glut1 ed è principalmente espresso nel fegato, reni, nelle cellule beta pancreatiche secernenti insulina e nelle cellule epiteliali della mucosa intestinale [23]. La sua funzione principale è regolare l'assorbimento del glucosio nel tratto gastrointestinale [23]. Glut2 partecipa all'assorbimento del glucosio, ma il suo substrato principale è la glucosamina. Inoltre, è responsabile del trasporto di fruttosio, galattosio e mannosio [23]. Poiché svolge un ruolo significativo nell'assorbimento dei carboidrati nell'intestino, è diventato un obiettivo di interesse per la prevenzione e il trattamento del diabete [23].

Glut3: è il secondo trasportatore più diffuso nel cervello, ma a differenza del Glut1, è ampiamente distribuito nei neuroni, in particolare nelle terminazioni nervose pre e post-sinaptiche e nei piccoli processi neuronali [24]. È espresso anche negli embrioni, nello sperma e nei globuli bianchi [24]. Glut3 presenta la più alta affinità con il glucosio tra tutti i trasportatori di classe I ed è in grado di trasportare anche il mannosio, il galattosio e lo xilosio [22]. La sovraespressione di Glut3 è stata osservata in molti tipi di tumori, inclusi quelli della mammella, del colon, dell'endometrio, del rene e del polmone [24]. Questa sovraespressione è associata all'aggressività dei glioblastomi e dei tumori cerebrali ricorrenti [24].

Glut4: Questo trasportatore è il principale responsabile del trasporto del glucosio nei muscoli striati e nei tessuti adiposi ed è anche il secondo più abbondante nel tessuto cardiovascolare [22]. Il suo substrato principale è il glucosio, ma è in grado di trasportare anche il mannosio, il galattosio, l'acido deidroascorbico e la glucosamina [22]. A differenza di altri trasportatori del glucosio, Glut4 è regolato dall'insulina [22]. È stato collegato all'obesità, al diabete di tipo 2 e alle malattie cardiache, rendendolo un promettente obiettivo terapeutico [22].

Glut14: Questo è il membro più recente identificato nella famiglia GLUT [25]. È un doppiante di Glut3, ma è espresso solo nel tessuto testicolare [25]. Le informazioni disponibili su questo trasportatore sono attualmente limitate [25].

Inoltre, oltre alla regolazione basata sui substrati, è stato scoperto che l'espressione di GLUT 1, 2, 3 e 4 è influenzata anche dagli ormoni [25]. Gli estrogeni e il progesterone sono stati collegati all'espressione di Glut nell'endometrio, suggerendo un ruolo cruciale del glucosio nella proliferazione e differenziazione dell'endometrio [25]. Un'espressione anomala di Glut è stata riscontrata in un'ampia gamma di tumori endometriali e gli ormoni steroidei sono stati collegati alla genesi del cancro endometriale [25].

Classe II dei trasportatori Glut.

I Glut di classe II presentano un'affinità significativamente più elevata per il fruttosio e per un'ampia gamma di substrati, compreso il glucosio [26]. Tra tutti i membri della famiglia Glut, il **Glut5** emerge come un trasportatore unico, poiché è specializzato esclusivamente nel trasporto del fruttosio [26]. La sua espressione prevalente si riscontra nell'intestino tenue ed è stato fortemente associato allo sviluppo, alla progressione e alle metastasi del cancro, rendendolo un bersaglio attraente per le terapie antitumorali [26]. L'aumento del consumo di fruttosio da parte dei tumori ha portato allo sviluppo di inibitori mirati al Glut5, al fine di ostacolare dell'assorbimento del fruttosio nelle cellule tumorali [26].

Glut7 è espresso principalmente nell'intestino tenue e nel colon, sebbene il suo mRNA sia stato rilevato anche nella prostata e nei testicoli [27]. Presenta un grado di somiglianza di sequenza del 44% rispetto al Glut5 [27].

I **Glut 9** e **Glut11** condividono rispettivamente il 58,1% e il 41,7% di identità di sequenza con Glut5 [22]. Tutti e tre questi trasportatori dimostrano un'elevata affinità sia per il glucosio e sia per il fruttosio [22]. Il Glut9 è espresso principalmente nel fegato e nei reni, mentre Glut11 è stato individuato in vari organi, tra cui il cuore, il muscolo scheletrico, il rene e il pancreas [22]. I Glut7 e Glut9 sono espressi anche nella membrana apicale dell'intestino tenue e del colon [22]. L'abbondanza di Glut7 e 9 nell'intestino tenue cambia in base all'assunzione di carboidrati con la dieta [22]. Tuttavia, la distribuzione di questi trasportatori lungo l'intestino tenue non sembra corrispondere del tutto alla disponibilità di glucosio e fruttosio, suggerendo la possibilità dell'esistenza di ulteriori substrati per questi trasportatori che rimangono ancora da identificare [22].

Classe III dei trasportatori Glut:

I membri di questa classe condividono un'omologia di sequenza limitata rispetto alla classe I e sono considerati strutturalmente atipici [22]. **Glut10** ha una somiglianza del 35% con Glut2 ed è in grado di trasportare glucosio [22].

Glut8 è espresso prevalentemente nei testicoli e si ritiene svolga un ruolo importante nel fornire il glucosio necessario agli spermatozoi [28]. Oltre al suo ruolo principale, è in grado di trasportare il fruttosio ed è espresso anche in altri tessuti come il fegato, la milza, il tessuto adiposo bruno e la blastocisti, anche se in quantità notevolmente minori [28].

Analogamente a Glut8, **Glut12** è in grado di trasportare sia glucosio e sia fruttosio e presenta caratteristiche simili a Glut4, ma con un'affinità notevolmente superiore per il glucosio [29]. È stata suggerita un'espressione regolata dall'insulina, poiché è espresso prevalentemente nel muscolo scheletrico, nel cuore e nei tessuti adiposi sensibili all'insulina [29].

HMIT, precedentemente noto come **Glut13**, rappresenta l'ultimo dei membri della famiglia Glut [30]. È un cotrasportatore H⁺/mio-inositolo e a differenza degli altri 13 trasportatori, HMIT non è coinvolto nel trasporto né del glucosio né del fruttosio [30]. Il suo unico substrato è il mio-inositolo e questo assorbimento dipende dal pH [30]. HMIT è ampiamente espresso nel cervello, in particolare nelle vescicole intracellulari dei neuroni, e la sua transizione verso la superficie cellulare può essere innescata dalla depolarizzazione cellulare [30].

3.2 La proteina trasportatrice Glut1

Il Glut1 è una proteina transmembrana responsabile del trasporto passivo di D-glucosio, D-galattosio, D-glucosamina e degli analoghi del glucosio 2-desossi-D-glucosio (2-DOG) e 3-O-metil-D-glucosio (3-OMG) [31]. Glut1 ha una distribuzione ubiquitaria con una notevole espressione nel cervello e negli eritrociti ed è principalmente responsabile dell'assorbimento cellulare del glucosio a livello basale in molti tessuti [31]. Glut1 è stato il primo membro identificato della famiglia GLUT a fornire l'assorbimento basale del glucosio attraverso le barriere tissutali, inclusa la barriera ematoencefalica (BBB) [31]. Il percorso del D-glucosio nel cervello è chiaramente definito: dai capillari cerebrali, viene assorbito dagli astrociti i quali impostano il percorso metabolico del glucosio o del suo metabolita glicolitico, L-lattato, fino ai neuroni [31]. Oltre a ciò, il glucosio ha la capacità di attraversare le giunzioni comunicanti e seguire direttamente il percorso neuronale [31] (Figura 1). In qualità di fonte alternativa di energia per il cervello, i corpi chetonici intraprendono un percorso distinto, entrando nel

cervello tramite il sistema di trasporto monocarbossilico (MCT1) [31] fornendo una fonte alternativa di acetil-CoA [31].

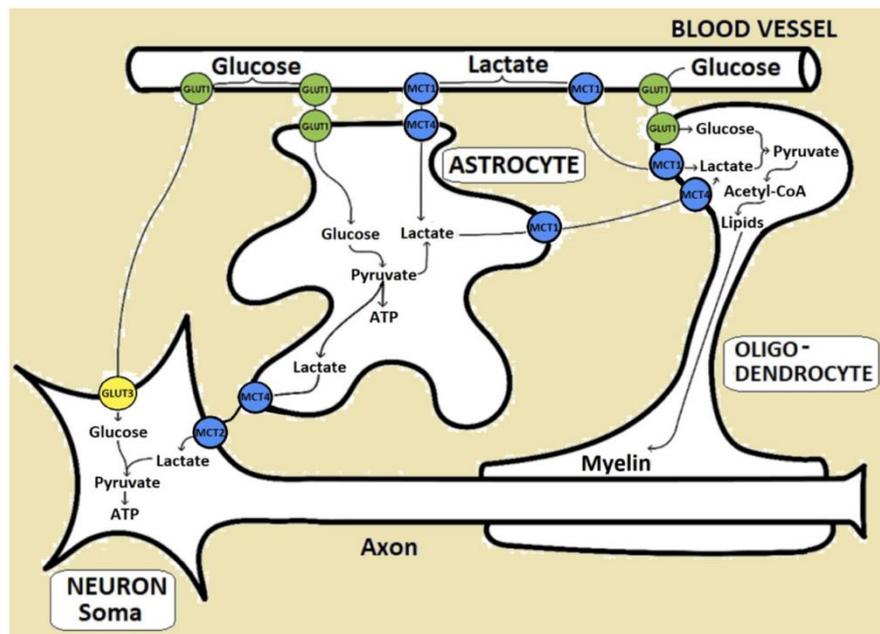


Figura 1. Rappresentazione dei flussi di glucosio e lattato attraverso la BBB. Trasportatori del glucosio: Glut1 (raffigurato in verde) è espresso nelle cellule endoteliali (parte della BBB) e nella membrana delle cellule gliali; Glut3 (giallo) è espresso nella membrana dei neuroni. MCT (famiglia dei trasportatori dei monocarbossilati) è raffigurata in blu: diverse isoforme (MCT1, MCT2, MCT4) sono espresse nelle cellule endoteliali (parte della BBB), neuroni, astrociti e oligodendrociti. Fonte [31]

L'espressione di Glut1 varia in relazione all'età, infatti durante lo sviluppo embrionale, il trasportatore è ampiamente espresso nelle cellule proliferanti; dopo la nascita, durante i primi mesi di vita, è presente principalmente nel cervello, nel miocardio e nei muscoli scheletrici e nel periodo adulto, i principali tessuti ricchi di Glut1 sono il cervello e gli eritrociti [31]. I trasportatori proteici di membrana coinvolti nell'assorbimento del glucosio fanno parte di una delle più grandi famiglie di trasportatori, denominata Superfamiglia dei Maggiori Facilitatori (MFS), un ramo della sottofamiglia degli Sugar Porters (SP), i cui membri sono responsabili dell'assorbimento di glucosio e altri monosaccaridi o disaccaridi attraverso la membrana cellulare [31]. I trasportatori MFS presentano un'astruttura molto simile. Sono caratterizzati da un canale centrale composto da aminoacidi altamente conservati e organizzati in 12 segmenti transmembrana che si organizzano in due domini distinti, noti come dominio amino-terminale e dominio carbossi-terminale [31]. All'interno di ciascun dominio, i sei segmenti transmembrana consecutivi sono ripiegati in una coppia di ripetizioni invertite "3+3" (Figura 2) [31]. Si ritiene che tutti i trasportatori MSF operino attraverso il meccanismo di trasporto ad accesso alternato, il quale implica che il sito di legame del substrato sia accessibile in modo

alternato da entrambi i lati della membrana, in seguito a cambiamenti conformazionali dei trasportatori [31]. Glut1 è una proteina integrale di membrana composta da 492 aminoacidi, caratterizzata dalla presenza di 12 segmenti transmembrana (TM1-TM12), con i domini N e C situati nel citoplasma [31]. Oltre ai domini TM, la struttura della proteina Glut1 presenta un anello intracellulare, situato tra i segmenti transmembrana TM6 e TM7 e un sito di glicosilazione nel primo anello extracellulare [31]. Allo stesso modo, verso il dominio C-ter (TM7-TM12) la proteina ha diversi siti funzionali: il sito di legame dell'ATP, sito di fosforilazione e il sito di legame dello zucchero localizzato tra TM8 e N317 [31]. Il ruolo principale del dominio N (TM1-TM6) è la regolazione della conformazione delle proteine durante il trasporto dello zucchero [31] (Figura 2).

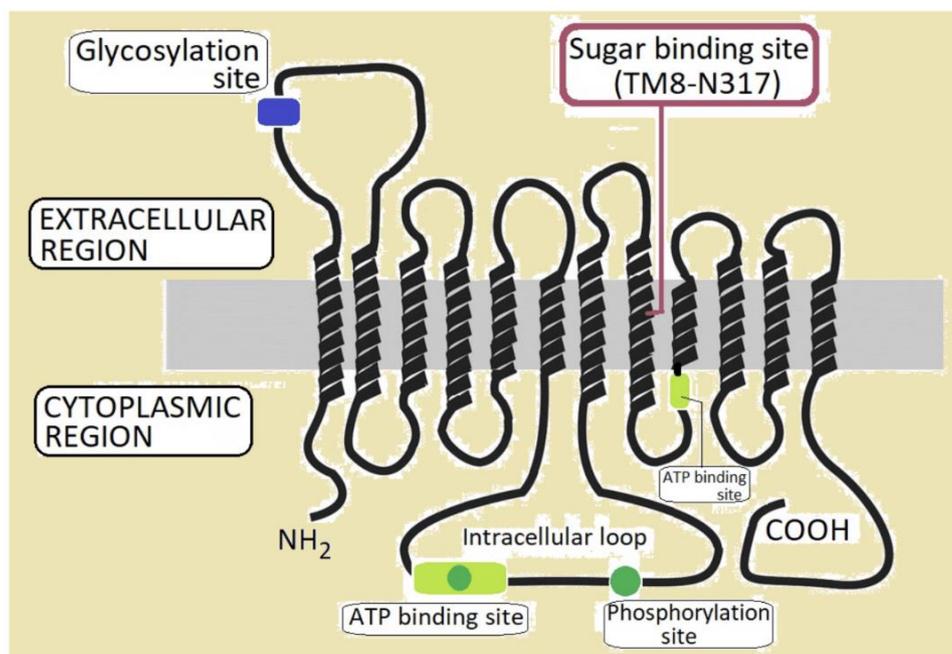


Figura 2: Un modello della struttura Glut1 con 12 domini TM e i principali siti funzionali: siti di legame dell'ATP, il sito di fosforilazione e il sito di legame dello zucchero nella posizione N317 del dominio TM8. Fonte [31]

Sono state segnalate strutture di omologhi batterici di GLUT1, nello specifico la proteina che fa un simporto D-xilosio/ H^+ chiamata Xyle di *Escherichia coli* e la proteina che opera un simporto glucosio/ H^+ chiamata GlcP di *Staphylococcus epidermidis* [32]. Per determinare la struttura di Glut1, è stata condotta la sovraespressione della proteina nelle cellule di insetti High Five infettate con baculovirus [32]. Questo processo risulta essenziale per ottenere una considerevole quantità della proteina di interesse. In seguito, è stata affrontata l'eterogeneità causata dalla glicosilazione, un processo mediante il quale i carboidrati vengono legati alle proteine [32]. Al fine di mitigare l'eterogeneità derivante da tale processo, è stata introdotta una

mutazione puntiforme N45T, provocando quindi una modifica in un residuo specifico della proteina [32]. La cristallizzazione ha rappresentato una fase importante per la determinazione della struttura tridimensionale di una proteina. Tuttavia, inizialmente, non è stata ottenuta la cristallizzazione della proteina GLUT1 (N45T) e si è avanzata l'ipotesi che la proteina potesse assumere diverse conformazioni, rendendo complicato il processo stesso [32]. Al fine di superare le difficoltà relative alla cristallizzazione, è stata effettuata una ricerca di varianti di GLUT1 in letteratura, che potessero bloccare il trasportatore in una specifica conformazione [32]. È emerso che una mutazione specifica, E329Q, è in grado di arrestare GLUT1 in una conformazione rivolta verso l'interno [32]. Questo ha reso possibile la cristallizzazione della proteina. Alla fine, è stato possibile cristallizzare GLUT1 con le mutazioni N45T ed E329Q, ottenendo cristalli di alta qualità con una risoluzione di 3,2 Å [32] (Figura 3).

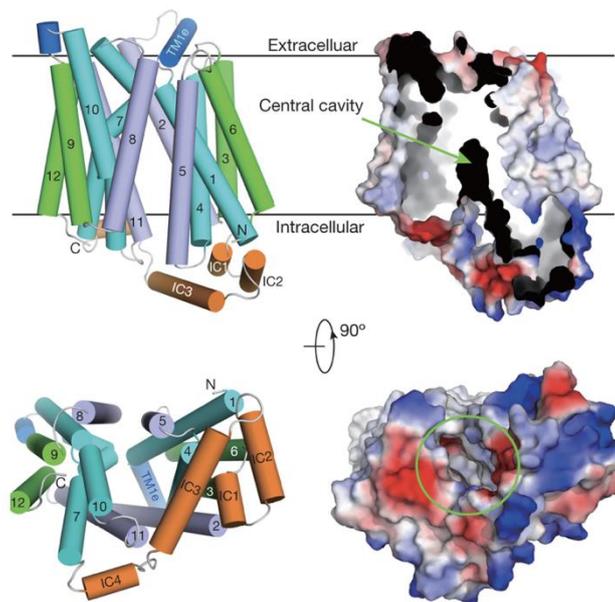


Figura 3: La struttura del GLUT1 umano a lunghezza intera contenente due mutazioni puntiformi (N45T, E329Q) è stata determinata in una conformazione aperta verso l'interno. Vengono mostrate le viste laterale e citoplasmatica. Fonte: [32]

Nella struttura di GLUT1, si osserva che i residui compresi tra la posizione 9 e la posizione 455 costituiscono la piega MFS canonica [32]. I domini N-ter e C-ter racchiudono una cavità che si apre sul lato intracellulare [32]. La struttura rappresenta quindi una conformazione aperta verso l'interno, coerente con lo stato previsto per GLUT1(E329Q) [32]. In particolare, i domini N-ter e C-ter risultano collegati da un fascio elicoidale intracellulare (ICH), il quale comprende quattro corte α -eliche [32]. È degno di nota il fatto che il dominio ICH è stato osservato anche nelle strutture dei trasportatori dello zucchero Xyle e GlcP, ma non in altre proteine della vasta

famiglia dei trasportatori MFS [32]. Tale osservazione suggerisce che il dominio ICH potrebbe costituire una caratteristica unica della sottofamiglia dei trasportatori dello zucchero [32]. Durante lo studio approfondito del modello atomico, nella cavità aperta verso l'interno è emersa una densità elettronica a forma di disco [32]. Poiché Glut1 è stato purificato e cristallizzato in presenza dello 0,4% (p/v) di n-nonil- β -D-glucopiranoside (β -NG), la densità elettronica osservata deriva dalla molecola β -NG legata [32]. Tale densità sembrerebbe correlarsi alla porzione zuccherina del β -NG, che a sua volta rappresenta un possibile substrato per il Glut1 [32]. La molecola β -NG si inserisce perfettamente all'interno della densità elettronica, con il D-glucopiranoside legato al dominio C di GLUT1, approssimativamente al centro della membrana, mentre la coda alifatica è orientata verso il lato intracellulare della cavità [32] (Figura 4).

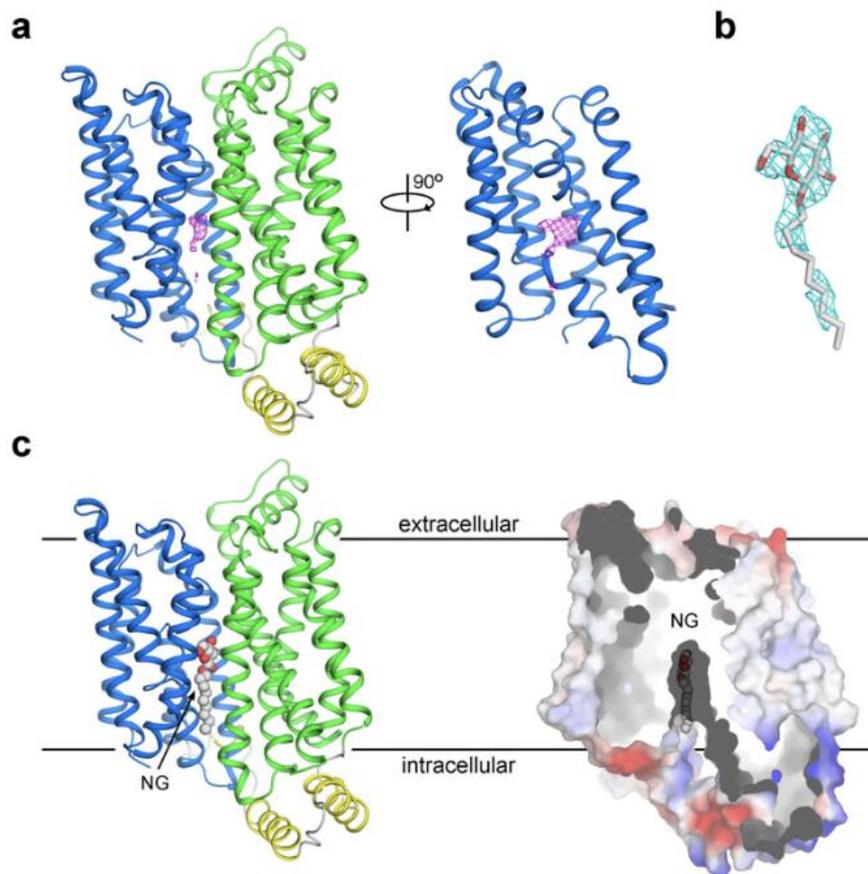


Figura 4. I domini N-ter, C-ter e ICH sono colorati rispettivamente in verde, blu e giallo. È rappresentata la struttura complessiva GLUT1 con la molecola β -NG legata. β -NG è rappresentato da sfere bianche. Fonte [32]

Sovrapponendo i domini C-ter del Glut1 e quelli del XyleE si è osservato che il D-glucopiranoside del β -NG si sovrappone al D-glucosio [32]. L'analisi, quindi, rivela che il D-glucopiranoside del β -NG è legato attraverso legami ad idrogeno ai residui polari circostanti

nel dominio C del GLUT1 [32]. Tale coordinazione è analoga a quanto osservato nella coordinazione del D-glucosio da parte del Xyle [32]. Dalle osservazioni effettuate emergono chiaramente due aspetti significativi: in primo luogo, il dominio C-ter sembra costituire il sito primario di legame del substrato, mentre, in secondo luogo, il movimento relativo del dominio N-ter sembra determinare un accesso alternato a tale sito [32]. Ciò suggerisce che il GLUT1 e il Xyle presentano un sito di legame per lo zucchero accessibile in modo alternato da entrambi i lati della membrana cellulare [32]. Le dettagliate informazioni strutturali relative alla proteina Glut1 costituiscono una base molecolare essenziale per l'analisi meccanicistica delle mutazioni che causano l'inattivazione di questa proteina [32]. Tali mutazioni sono state riscontrate in pazienti affetti da una serie di condizioni mediche, tra cui la sindrome da deficit di Glut1 [32]. La maggior parte delle mutazioni sostituiscono gli amminoacidi polari o carichi, che probabilmente hanno un ruolo funzionale, piuttosto che strutturale [32]. È chiaro quindi che le mutazioni che intaccano l'integrità strutturale di Glut1 possano comportare una completa perdita della sua funzione, con potenziali conseguenze letali [32]. Le mutazioni legate alla patologia mostrano una concentrazione significativa in tre specifici raggruppamenti all'interno della struttura di Glut1 [32]. Il cluster I, per esempio, comprende residui che sono coinvolti nel legame del substrato [32]. Il cluster II si colloca all'interfaccia tra il dominio transmembrana e il dominio ICH o canale intracellulare [32]. Il cluster III, invece, è composto da residui che delimitano il percorso di trasporto, che sono per lo più impegnati nelle interazioni tra i domini N-ter e C-ter sul lato extracellulare [32]. In particolare, le mutazioni che coinvolgono i residui legati al substrato possono compromettere in modo significativo il riconoscimento del D-glucosio e ridurre notevolmente l'efficienza del processo di trasporto [32] (Figura 5).

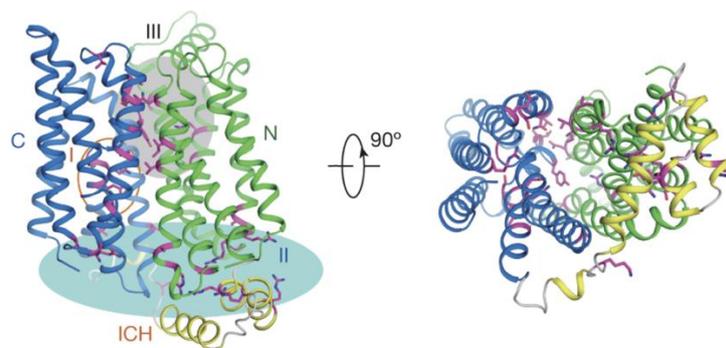


Figura 5: Mappatura strutturale delle mutazioni derivate dalla malattia in Glut1. I residui per i quali sono state identificate mutazioni in pazienti con sindrome da deficit di GLUT1 e altri sintomi sono colorati in magenta. Il cerchio arancione e le sfumature grigie e ciano indicano i tre principali gruppi di residui per i quali le mutazioni sono associate a malattie. I domini N, C e ICH sono colorati rispettivamente in verde, blu e giallo. Fonte [32]

CAPITOLO 4

TRATTAMENTO DELLA SINDROME DA DEFICIT DI GLUT1

4.1 L'importanza della dieta chetogenica

Come descritto precedentemente, un ridotto apporto di “combustibile” al cervello è strettamente collegato con l'insorgenza di disturbi neurologici come l'epilessia e ritardo nello sviluppo. Numerosi studi hanno dimostrato che la dieta chetogenica (Ketogenic Diet, KD) contenente una grande percentuale di lipidi rispetto ad altri nutrienti è, spesso, utilizzata come terapia e/o costituisce spesso un salvavita [33]. Attualmente, la KD rappresenta lo *standard* di cura per la sindrome da deficienza di Glut1. Infatti, una dieta ricca di grassi aumenta la concentrazione ematica di corpi chetonici nel sangue rendendoli disponibili al cervello [34]. I chetoni come il β -idrossibutirrato e l'acetoacetato sono alternativi, sebbene imperfetti, sostituiti del glucosio cerebrale. Infatti, attraversano la barriera emato-encefalica (BBB) attraverso il trasportatore dei monocarbossilati 1 (MCT1), e apportano energia al cervello fungendo da fonte di acetil CoA che viene immesso nel ciclo di Krebs (TCA) [35]. I principali corpi chetonici derivati dalla dieta, il β -idrossibutirrato (BHB) e l'acetoacetato (AcAc), contengono quattro atomi di carbonio e, quando metabolizzati, producono preferenzialmente due molecole di Acetil coenzima A a due atomi di carbonio ciascuna. Questa molecola dicarbonio è anche il principale sottoprodotto dell'ossidazione del glucosio [35]. L'inizio precoce di questa terapia favorisce la crescita cerebrale e la normale funzione cerebrale nel periodo adulto della vita; la malattia generalmente si stabilizza dopo la pubertà. Il principale effetto benefico della dieta chetogenica è il controllo delle convulsioni; dopo aver iniziato la terapia, i pazienti generalmente presentano un rapido miglioramento nel controllo delle crisi. Altri effetti positivi di una dieta chetogenica sono legati al miglioramento dei sintomi motori e cognitivi, ma i risultati sono variabili [36].

La diagnosi di Glut1DS viene, spesso, fatta tardi, molto più tardi rispetto alla comparsa di manifestazioni cliniche quali convulsioni e ritardo mentale; per questo motivo, le crisi epilettiche sono, generalmente, trattate attraverso la somministrazione di farmaci [36]. Una volta stabilita la diagnosi la KD, come detto, rappresenta la prima scelta di trattamento nei pazienti Glut1DS, poiché si è dimostrata efficace nel controllo dei disturbi epilettici e del movimento [36]. La KD è molto importante per fornire carburante metabolico sufficiente a supportare la crescita e lo sviluppo ottimali del cervello durante l'infanzia e la fanciullezza

[36]. Un'accurata valutazione clinica è il punto di partenza per definire la strategia terapeutica. La KD necessita di un attento monitoraggio da parte di un team multidisciplinare, che comprenda neurologi e dietologi qualificati. In sostanza, la KD è molto povera di carboidrati e di proteine e ricca di grassi [36]. L'apporto calorico dovrebbe essere pari a circa il 5% di carboidrati, il 20% di proteine e il 75% di grassi, anche se ci sono versioni ancor più restrittive fino ad arrivare ad un rapporto 4:1 in cui ogni 4 parti di grassi possono essere abbinati a 1 parte di Proteine e Zuccheri. In genere, i carboidrati sono limitati a circa 20 grammi il giorno [37]. Ciò significa eliminare, o ridurre al minimo, carne e formaggio, pasta e pane (Figura 6). Quando si segue una KD come raccomandato, il corpo entrerà in uno stato di chetosi dopo alcuni giorni [37]. Quando i carboidrati sono drasticamente limitati, il corpo non ha abbastanza glucosio da poter essere utilizzato come energia dai tessuti, i muscoli e il cervello. Il cervello e i muscoli utilizzano il glucosio contenuto nei carboidrati come principale fonte di energia; quindi, per soddisfare la richiesta di carburante il fegato crea una fonte di energia alternativa chiamata corpi chetonici attraverso un processo chiamato chetogenesi [37]. Di solito la chetogenesi inizia dopo 2-3 giorni di livelli molto bassi assunzione di carboidrati. La KD rappresenta la prima scelta terapeutica nei pazienti Glut1DS [36] e come già evidenziato, una KD è una dieta ricca di grassi che imita lo stato metabolico di fame, in cui il metabolismo del glucosio viene commutato al metabolismo dei corpi chetonici. Questo tipo di dieta "costringe" il corpo a ossidare i grassi anziché i carboidrati producendo, così, corpi chetonici in grado di penetrare la barriera emato-encefalica e fungere da combustibile alternativo per il metabolismo cerebrale [37].

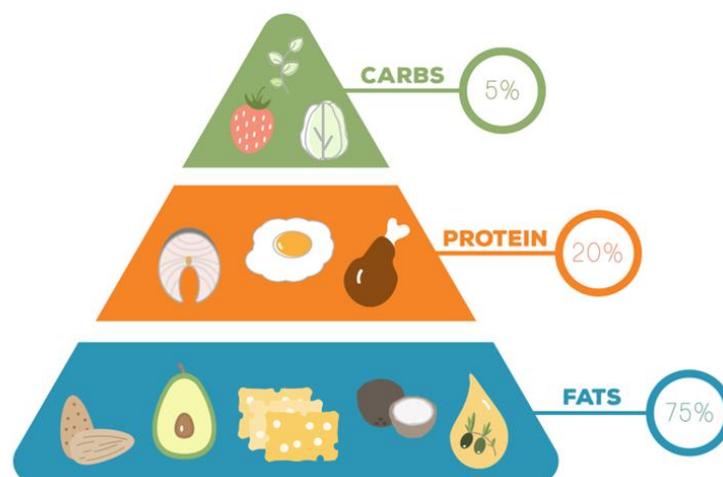


Figura 6: Piramide alimentare della dieta chetogenica. Fonte [37]

La biosintesi dei corpi chetonici è collegata a molteplici vie metaboliche, tra cui il ciclo degli acidi tricarbossilici, la β -ossidazione degli acidi grassi, la lipogenesi *de novo*, la biosintesi degli steroli, il metabolismo del glucosio e la catena di trasporto degli elettroni mitocondriali [37]. Inoltre, anche la segnalazione ormonale e le vie di trasduzione del segnale intracellulare sono influenzate dai corpi chetonici [37]. La comprensione del ruolo fisiologico dei corpi chetonici, e in particolare del BHB, è stata molto studiata e recenti studi hanno dimostrato che il BHB agisce come un inibitore dell'istone deacetilasi, favorendo così l'iperacetilazione degli istoni che è stata associata alle proprietà antiossidanti del BHB in un modello murino [37]. Inoltre, è stato proposto che il BHB agisca come una molecola antinfiammatoria andando ad agire direttamente sull'inflammasoma, ovvero oligomero multiproteico citosolico del sistema immunitario innato responsabile dell'attivazione delle risposte infiammatorie [38]. Infine, è stata dimostrata una nuova modifica post-traduzionale degli istoni denominata β -idrossibutirilazione, che consiste nella formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico BHB e il gruppo amminico ϵ della lisina [38]. Questa scoperta ha ampliato il repertorio dei PTM (modificazioni post-traduzionali) istonici e ha identificato il BHB come una molecola coinvolta nel controllo epigenetico della trascrizione [39]. Dato che l'endotelio è il tessuto di prima linea esposto ai corpi chetonici circolanti e considerando che è stato dimostrato che il BHB possiede/supporta/media caratteristiche antinfiammatorie e antiossidanti, negli ultimi anni un forte interesse è stato rivolto alla comprensione dell'effetto del BHB sulla fisiologia delle cellule endoteliali vascolari (EC) [40]. Fondamentalmente, per un paziente Glut1DS la dieta consiste in 3-4 g di grassi, a seconda dell'età del paziente, per ogni g di carboidrati e proteine combinati (3:1 o 4:1 KD) [41]. Ciò si ottiene escludendo gli alimenti ricchi di carboidrati aumentando, al contempo, il consumo di cibi ricchi di grassi che forniscono l'87 – 90% delle calorie giornaliere [41]. Ad oggi, la maggior parte dei pazienti affetti da Glut1DS viene trattata con il classico KD 3:1 o 4:1. Nei bambini di età inferiore ai 2 anni, un KD 4:1 può essere più efficace nello stimolare la chetogenesi, ma potrebbe non fornire proteine sufficienti per la crescita [41]. Recenti studi mostrano come una KD 4:1 potrebbe essere efficace nei neonati con fenotipo grave, mentre un rapporto 3:1 dovrebbe essere proposto nel fenotipo lieve nei neonati e nel fenotipo lieve e grave di tutte le età [41]. Originariamente, i pazienti erano costretti a digiunare all'inizio della dieta chetogenica. Ciò mirava a favorire un rapido raggiungimento dello stato di chetosi o ad aumentare l'efficacia della dieta nel promuovere la produzione di corpi chetonici. Durante questo periodo, l'assunzione di calorie

e liquidi era limitata, e la dieta veniva avviata in un ambiente ospedaliero [41]. Nel 2004 Kim e colleghi hanno dimostrato che il digiuno iniziale e la restrizione dei liquidi non sono essenziali per la KD e che la tollerabilità di questo trattamento può essere migliorata non digiunando [42]. Nonostante questi cambiamenti, la rigorosa limitazione sia dei carboidrati sia delle proteine e l'alto contenuto di grassi nel classico KD rendono difficile produrre pasti gustosi e variabili. La dieta costituisce una vera e propria terapia medico nutrizionale e i pazienti devono seguire un protocollo ben definito di introduzione e mantenimento. È necessaria molta disciplina per mantenere la KD e, spesso, è una sfida mantenere la conformità alla dieta [42]. Per questo motivo, negli ultimi anni, sono state sviluppate diverse KD "nuove": la KD dei trigliceridi a catena media (MCT), la dieta Atkins modificata (MAD) e il trattamento a basso indice glicemico (LGIT) [41]. La MCT KD utilizza più trigliceridi chetogenici, quindi il rapporto grassi/carboidrati e proteine potrebbe essere abbassato approssimativamente a 1,2:1 ed essere più appetibile [43]. Tuttavia, la dieta MCT ha potenziali effetti collaterali gastrointestinali e l'esperienza clinica, soprattutto nel caso di Glut1DS, è limitata. La MAD è relativamente nuova [43] e potrebbe rappresentare un'alternativa meno restrittiva alla tradizionale KD. Si può iniziare in regime ambulatoriale, senza digiuno, prevede proteine illimitate, circa 10 g di carboidrati con rapporto grassi/magri 1:1. Nonostante la chetonemia raggiunta è significativamente inferiore rispetto alla KD classica, è stata dimostrata un'efficacia comparabile anche nei pazienti Glut1DS [43]. Inoltre, l'accettazione di questa dieta è maggiore poiché la gestione quotidiana e la scelta degli alimenti dietetici sono più facili e il gusto è migliorato. A differenza delle diete precedentemente descritte, la LGIT liberalizza la restrizione dei carboidrati e seleziona il tipo di alimenti contenenti carboidrati tra quelli che producono cambiamenti relativamente piccoli nella glicemia [44]. Di tutte le diete chetogeniche, la LGIT ha una concentrazione ematica di chetoni più bassa e la migliore tollerabilità, ma ci sono ancora dati limitati sull'efficacia paragonabile alla classica KD [44], in particolare su Glut1DS. Sebbene, nell'epilessia, il meccanismo d'azione alla base dell'efficacia della KD non sia ancora chiaro, nella Glut1DS fornisce essenzialmente una fonte di carburante alternativa [45]. Finora, l'ambito dei sintomi in cui l'effetto della KD è stato valutato più sistematicamente è il controllo delle crisi. La maggior parte dei pazienti con convulsioni sperimenta un miglioramento nel controllo delle crisi all'inizio della KD [41]. La stragrande maggioranza dei pazienti Glut1DS ottiene la scomparsa delle crisi epilettiche con la classica formula 4:1 o 3:1, consentendo la sospensione della terapia anticonvulsivante, e il miglioramento è spesso rapido [41]. In uno studio retrospettivo di Pong e collaboratori [46],

due terzi dei 41 pazienti che hanno avuto una risoluzione completa delle crisi (28/41) lo hanno fatto entro una settimana dall'inizio della dieta. La KD ha anche un effetto positivo su un altro sintomo peculiare della Glut1DS: il disturbo parossistico del movimento e, in particolare, la discinesia parossistica (PED). È stata osservata una risposta molto favorevole di questo sintomo alla dieta, attribuita alla fonte alternativa di energia derivata dai corpi chetonici. [46]. L'effetto della KD su altri sintomi motori e cognitivi è più variabile ed è stato caratterizzato in modo meno dettagliato rispetto alle crisi convulsive o alla risposta PED. Un chiaro miglioramento dei sintomi motori è stato documentato in singoli pazienti con disturbi del movimento persistenti, tra cui corea, distonia e atassia [41]. Tuttavia, il beneficio non è universalmente osservato. L'impatto del trattamento della KD sul ritardo dello sviluppo sembra essere meno evidente [47]. Tuttavia, molti genitori hanno notato un miglioramento della vigilanza, dell'attività, dell'attenzione e della concentrazione dei propri figli all'inizio della KD, probabilmente a causa di una maggiore disponibilità di ATP nel sistema nervoso centrale [47]. Tuttavia, l'effetto sulla cognizione a lungo termine è stato più difficile da quantificare e distinguere dal beneficio attribuibile al controllo delle crisi convulsive refrattarie. La letteratura contiene numerose segnalazioni di miglioramento del deterioramento psicomotorio, ma queste sono difficili da verificare in studi caso-controllo e sono necessari ulteriori approfondimenti per comprendere meglio il meccanismo d'azione della dieta [47]. Recenti lavori scientifici hanno dimostrato che l'introduzione della KD nei primi anni di vita nei pazienti con Glut1DS garantisce un migliore risultato cognitivo. Poiché il cervello in via di sviluppo nel bambino piccolo richiede più energia, la KD dovrebbe essere iniziata il prima possibile ogni volta che si sospetta Glut1DS [41]. Esistono anche segnalazioni di assunzione volontaria di grandi quantità di alimenti contenenti grassi in pazienti successivamente diagnosticati come Glut1DS [41]. Infine, ci sono pazienti in cui la KD non è stata pienamente efficace [41]; infatti si sono verificati effetti collaterali legati alla KD, come livelli elevati di lipidi nel sangue o ritardo della crescita, oppure si sono verificati problemi significativi di compliance nell'adolescenza o semplicemente derivanti da anni di rigorosa KD [41]. In questo caso, la MAD potrebbe essere considerata un'opzione interessante e numerosi studi recenti sul Glut1DS ne hanno dimostrato l'efficacia [48]. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi sui meccanismi fisiopatologici e sui potenziali effetti di nuove "diete" o "terapie" per questa patologia [48]. Tuttavia, circa il 20% di pazienti Glut1DS sottoposti a KD presenta difficoltà di *compliance* oppure la stessa dieta perde la sua efficacia nel tempo; per questi motivi è necessario individuare nuove strategie terapeutiche. Inoltre, la dieta chetogenica è metabolicamente carente: i combustibili alternativi

forniti dai corpi chetonici, siano essi ingeriti come coniugati di altre sostanze o prodotti dopo il consumo della dieta chetogenica, mancano di potenziale anaplerotico [49]. Questo perché i grassi alimentari e i loro corpi chetonici derivati contengono un numero pari di atomi di carbonio e vengono completamente consumati nel ciclo TCA attraverso la formazione dell'acetil coenzima A [50]. Al contrario, i substrati metabolici contenenti un numero dispari di atomi di carbonio maggiore di 5 possono alimentare il ciclo del TCA attraverso la formazione sequenziale di una o più molecole di acetil coenzima A con due atomi di carbonio ciascuna. Questo processo alimenta anche l'anaplerosi, che è il ripristino dei composti intermedi consumati nel ciclo del TCA. Pertanto, integrare la dieta chetogenica può essere utile per mitigare l'insufficienza metabolica, poiché fornisce substrati che possono alimentare il ciclo del TCA e supportare l'anaplerosi, garantendo così un adeguato apporto di energia al corpo. [50]

4.2 I problemi legati alla dieta chetogenica

Come ogni cambiamento significativo nella dieta, quando si inizia una KD è normale avere uno o più effetti collaterali mentre il corpo si adatta a un nuovo modo di nutrirsi. Quando si segue una KD, il corpo deve cambiare la sua fonte di carburante dal glucosio contenuto nei carboidrati all'utilizzo delle proprie riserve di grasso e, questo, può portare ad avere perdita di sali, Cheto-Flu, cambiamenti nelle abitudini intestinali, crampi alle gambe, alito cattivo e, perdita di energia. Di solito, questi effetti collaterali sono temporanei e possono essere risolti [51]. Analizzando più nel dettaglio i singoli effetti collaterali:

- *Perdita di Sali.* Entro le prime due settimane di una dieta chetogenica possono verificarsi cambiamenti nell'equilibrio dei liquidi. Infatti, in un metabolismo basato sul consumo di glicogeno, viene rilasciata acqua nel sangue andando ad interferire con la concentrazione di sali minerali. Questo meccanismo tende a ridursi e di conseguenza, è possibile riscontrare una perdita di liquidi e sali durante una KD. Sali minerali importanti, oltre al sodio, sono il potassio e il magnesio [52].
- *Cheto-Flu.* Le prime settimane di transizione verso una KD possono essere difficili per alcune persone, mentre altri pazienti si adattano più facilmente. Il processo di adattamento metabolico dal consumo di glucosio a quello di lipidi con i chetoni come principale fonte di energia per il sistema nervoso centrale è noto come cheto-adattamento [51]. Questo può provocare un certo "annebbiamento cerebrale" iniziale che scomparirà una volta che l'organismo si sarà completamente adattato. Si stima che

il cheto-adattamento richieda in media circa quattro settimane, ma gli effetti collaterali spesso scompaiono prima. Durante questo periodo, e soprattutto alla fine della prima settimana, è probabile che si possa avvertire alcuni sintomi simili all'influenza, come annebbiamento cerebrale/pensiero lento, vertigini, fatica, battito cardiaco accelerato soprattutto in posizione supina, e insonnia [51].

- *Cambiamenti nelle abitudini intestinali.* Il passaggio ad una dieta chetogenica può comportare cambiamenti nelle abitudini intestinali, come la stitichezza. Questo è, spesso, il caso di qualsiasi cambiamento importante nella dieta poiché i batteri intestinali dovranno adattarsi per gestire cibi diversi in quantità differenti. Le abitudini intestinali dovrebbero solitamente migliorare entro un paio di settimane, e questo processo può essere accelerato dall'assunzione di una buona quantità di fibre e dal bere molta acqua [51].
- *Crampi alle gambe.* Lo sviluppo di crampi muscolari è un possibile effetto collaterale di una KD, generando uno stato di frustrazione nei pazienti. Una delle cause è una condizione definita "iponatriemia", che si verifica quando il livello di sodio nel sangue è troppo basso [52].
- *Alito cattivo.* L'alitosi, a volte indicato come alito cheto, perché queste molecole possono essere rilasciate nel respiro, così come nelle urine e nel sudore. L'acetone è una forma di chetone che, quando rilasciato nell'alito, può provocare un sapore metallico in bocca o un alito dall'odore poco gradevole. Questo effetto è, di solito, temporaneo e tende a scomparire dopo alcune settimane [51].
- Nonostante la sua efficacia clinica, la somministrazione a lungo termine di una KD impone requisiti e restrizioni rigorosi ai pazienti con Glut1DS, che possono aumentare significativamente il rischio di eventi avversi (*Adverse Events*, AE) [51]. Questi eventi avversi sono stati studiati in bambini con convulsioni e comprendono ritardo della crescita, un profilo di rischio cardiovascolare avverso, nefrolitiasi e osteopenia [52]. Il primo rapporto sugli effetti deleteri della KD sulla massa ossea risale al 1979 [52]. Più recentemente, studi su bambini con epilessia intrattabile hanno costantemente dimostrato che una KD prolungata può indurre una progressiva perdita di contenuto minerale osseo (BMC) associata a uno scarso stato di salute delle ossa, probabilmente come conseguenza di un ambiente acido cronico [52]. Tuttavia, gli effetti a lungo termine di una KD sullo stato minerale osseo dei pazienti con Glut1DS sono attualmente sconosciuti. Una ricerca di Bertoli e colleghi [53] ha cercato di determinare

gli effetti a lungo termine di una KD sulla composizione corporea e sullo stato minerale osseo dei pazienti con Glut1DS, attualmente sconosciuti. In una serie di casi discussi nello studio, sono stati riportati i cambiamenti nella composizione corporea e nello stato minerale osseo osservati in tre pazienti adulti con Glut1DS che sono stati trattati con una KD per più di 5 anni [53]. La dieta a lungo termine non ha prodotto cambiamenti apprezzabili nel peso e nella composizione corporea degli adulti con Glut1DS. Inoltre, gli autori non hanno trovato prove di potenziali effetti avversi di una KD sulla salute delle ossa [53]. I dati degli autori suggeriscono che il mantenimento di una KD per più di 5 anni non comporta alcun effetto negativo importante sulla composizione corporea, sul contenuto minerale osseo e sulla densità minerale ossea negli adulti con Glut1DS, un risultato che è in contrasto con i rapporti precedenti concentrandosi sui bambini con epilessia intrattabile [53]. Come detto, la KD in Glut1DS rappresenta attualmente il trattamento di scelta dall'infanzia all'età adulta, il che ha sollevato preoccupazioni su potenziali rischi cardiovascolari a lungo termine. I dati disponibili sulla KD nell'epilessia infantile intrattabile sono limitati a *follow-up* di sei mesi con *follow-up* individuale fino a tre anni. Diversi studi su circa 400 bambini sottoposti a KD hanno affrontato queste preoccupazioni indagando i profili lipidici del sangue, nonché lo spessore della parete intima carotidea (CIMT) e la distensibilità dei vasi, misurata mediante ecografia dell'arteria carotide [54]. I risultati ad oggi sono ancora limitati, sebbene alcuni studi riportino un aumento dei lipidi sierici e cambiamenti dello spessore della parete intima [54]. Per chiarire ulteriormente i potenziali rischi cardiovascolari durante la KD, Heussinger e collaboratori [55] hanno eseguito un *follow-up* prospettico a lungo termine di ≥ 10 anni nei pazienti Glut1DS sottoposti a KD. In particolare, sono stati arruolati pazienti Glut1DS per il trattamento con KD, e il *follow-up* minimo è stato di 10 anni [55]. I punteggi di deviazione standard (SDS) dell'indice di massa corporea (BMI), del colesterolo totale (TC), del colesterolo HDL/LDL e dei trigliceridi (TG) prima dell'inizio della KD sono stati confrontati con i rispettivi valori a 6 mesi, 2, 5 anni e 10 anni dopo l'iniziazione. Dopo 10 anni di KD, il rischio cardiovascolare, valutato mediante BMI, misurazione dello spessore intima-media carotideo (CIMT) e pressione sanguigna, è stato confrontato con una popolazione sana di riferimento. Sono stati resi disponibili indagini al basale e di *follow-up* a 10 anni per 10 individui con Glut1DS in KD e si è osservato che dopo due anni di KD, il BMI è aumentato significativamente, mentre il colesterolo totale, il colesterolo HDL e il colesterolo LDL

sono diminuiti [55] . Entro 3-5 anni dalla KD queste differenze sono scomparse, e dopo 10 anni i parametri lipidici nel sangue riflettevano la situazione all'inizio della KD. Prima della KD un bambino aveva dislipidemia, ma nessuno dopo 10 anni di KD. Non sono state osservate differenze significative rispetto al BMI, allo CIMT o alla pressione arteriosa sistolica e diastolica nei bambini Glut1DS trattati con KD per almeno 10 anni, rispetto ai controlli sani [55] . Gli autori hanno quindi concluso che, contrariamente ai precedenti rapporti a breve termine sugli effetti avversi della KD, il *follow-up* a 10 anni non ha identificato i rischi cardiovascolari del trattamento dietetico per pazienti Glut1DS [55].

CAPITOLO 5

TRATTAMENTI ALL'AVANGUARDIA

5.1 Nuovi approcci farmacologici

I farmaci a disposizione oggi sono in realtà una strategia aggiuntiva per il controllo delle convulsioni nei pazienti con sintomi più lievi. Fenobarbital, valproato, carbamazepina, lamotrigina, topiramato e clonazepam sono i farmaci antiepilettici (AED) più frequentemente utilizzati [10]. Tuttavia, nella Glut1DS, le convulsioni sono, generalmente, refrattarie al trattamento farmacologico ed infatti, solo circa l'8% dei pazienti riesce a controllare le crisi con il solo trattamento farmacologico antiepilettico [10]. Pazienti a cui il Glut1DS viene diagnosticato in età adulta spesso, presentano sintomi minimi come ad esempio, convulsioni poco frequenti, e per loro un trattamento con farmaci antiepilettici, senza introduzione di una KD, è sufficiente per gestire la patologia. Inoltre, va tenuto presente che nella Glut1DS alcuni farmaci antiepilettici hanno il potenziale di esacerbare le convulsioni. Ad esempio, i barbiturici possono inibire in modo competitivo il trasportatore Glut1[56] e provocare un aumento della frequenza delle crisi. Al contrario, durante la fase postprandiale è stato descritto un miglioramento transitorio delle convulsioni e dei risultati dell'elettroencefalogramma (EEG) [56]. Dovrebbero essere quindi evitati i farmaci che, potenzialmente, alterano la funzione Glut1, inclusi caffeina, fenobarbital, diazepam, valproato e antidepressivi triciclici [56]. È stato riportato che le discinesie parossistiche rispondono bene al trattamento con acetazolamide, in alcuni casi [57]. Questo può essere un trattamento alternativo per le discinesie quando il rispetto della dieta è difficile. In ogni caso, i farmaci non correggono il nutrimento inadeguato necessario per la crescita e lo sviluppo del cervello. La disponibilità di carburante rimane fondamentale per il risultato ottimale a lungo termine in questa condizione clinica.[57] Anche l'acido α -lipoico e la triptanoina sono stati proposti come opzioni terapeutiche nel Glut1DS. L'acido α -lipoico è un antiossidante che funge da coenzima nel metabolismo energetico [57]. Neutralizza i radicali liberi, migliora l'assorbimento del glucosio cellulare stimolando la cascata del segnale dell'insulina, riduce l'infiammazione e si lega ai metalli. La sua integrazione è stata raccomandata nel Glut1DS sulla base dell'osservazione che migliora il trasporto del glucosio nelle cellule muscolari in coltura attraverso la mobilitazione del glucotrasportatore dai pool intracellulari [57], ma tuttavia, ad oggi, non esistono dati pubblicati sull'uomo che ne dimostrino l'efficacia. UX007 o triptanoina è un trigliceride che è stato

utilizzato come substrato anaplerotico nell'uomo per trattare malattie metaboliche ereditarie come il *deficit* di piruvato carbossilasi e il *deficit* di carnitina palmitoiltransferasi II [58]. La logica alla base di UX007 in Glut1DS è che la trieptanoina viene metabolizzata in eptanoato e corpi chetonici composti di carbonio C4 e C5, che attraversano facilmente la barriera emato-encefalica tramite trasportatori monocarbossilati e possono potenziare l'effetto dei chetoni regolari come combustibile alternativo per il cervello [59]. UX007 potrebbe fornire substrati anaplerotici per rifornire gli intermedi del ciclo di Krebs, e può supportare la gluconeogenesi nel cervello. Sono stati pubblicati studi sperimentali che hanno valutato UX007 e i suoi metaboliti nei modelli animale di topo e ratto. La trieptanoina si è rivelata efficace in quattro modelli animali di epilessia, simile a quella di altri farmaci antiepilettici [59]. Il trattamento con trieptanoina consente un maggiore apporto di carboidrati e livelli di glucosio sierico più elevati rispetto alla KD e quindi non esacerba la carenza di trasporto del glucosio nel cervello [59]. Tra le piccole molecole utilizzate nel trattamento della Glut1DS c'è l'acetazolamide, un inibitore dell'anidraasi carbonica e un anticonvulsivante che promuove il trasporto di ioni attraverso la BBB alterando, così, il pH intracellulare [57]. Sebbene non sia chiaro esattamente come questo inibitore sia in grado di ridurre la sintomatologia nella Glut1DS, è stato utilizzato con successo per attenuare la discinesia parossistica in un paziente affetto da questa sintomatologia [57]. Piccole molecole possono anche essere utilizzate per aumentare l'espressione di Glut1 e/o la sua attività. Ciò è particolarmente fattibile dal punto di vista terapeutico considerando la presenza di almeno un gene *SLC2A1* intatto nella maggior parte dei pazienti con Glut1DS, e questo è ampiamente supportato dalle pubblicazioni presenti in letteratura che descrivono percorsi molecolari in grado di convergere sulla proteina Glut1. Una piccola molecola che è stata raccomandata per il trattamento della malattia, in base alla sua capacità di stimolare la traslocazione di Glut1/4 e quindi di migliorare l'assorbimento del glucosio, è l'acido α -lipoico o acido tiottico come sottolineato in precedenza [60]. La traslocazione di Glut1 nella membrana delle cellule endoteliali cerebrali, probabilmente fondamentale per la sua capacità di facilitare il trasporto del glucosio, è influenzata anche dal fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1R). Il *knockdown* di IGF-1R aumenta i livelli di Glut1 sulla superficie cellulare, un effetto probabilmente mediato dalla proteina C-terminale che interagisce con GAIP (GIPC) nota per legare sia il dominio PDZ di Glut1 e sia IGF-1R [60]. Perdita del dominio PDZ, o carenza di GIPC, ha ridotto i livelli di Glut1 sulla superficie cellulare e ha portato al targeting della proteina trasportatrice Glut1 verso i lisosomi, organelli cellulari deputati alla degradazione delle proteine [60].

Infine, numerosi studi hanno dimostrato gli effetti di FGF21 o fattore di crescita delle fibre muscolari 21, sulla trascrizione di Glut1 che agisce, almeno in parte, inducendo la fosforilazione dei fattori di trascrizione Serum Response Factor (SRF) ed Elk-1 che legano elementi nel promotore Glut1 per attivare la trascrizione [61]. I mimetici di FGF21 potrebbero, in linea di principio, avere gli stessi effetti. Alcuni di questi sono stati sviluppati per la cura dell'obesità, di dislipidemie e nel diabete, e potrebbero trovare utilizzo anche per Glut1DS [62]. Allo stesso modo, piccole molecole che alterano una o più delle vie di segnalazione qui identificate potrebbero diventare uno strumento per migliorare l'espressione di Glut1 per il trattamento di Glut1DS aplo-insufficiente. Considerando circa il 12% del Glut1 totale che è citoplasmatico e che presumibilmente può essere mobilitato sulla superficie delle cellule endoteliali per effettuare il trasporto del glucosio, e l'aumento nominale (~25%) dell'espressione di Glut1 richiesto per cancellare i sintomi della malattia, una piccola molecola o il potenziatore biologico dell'espressione/attività di Glut1 deve avere solo un effetto modesto per un valore terapeutico significativo [62]. Nel prossimo futuro dovrà essere valutato l'utilizzo di un test specifico e sensibile delle molecole esistenti e uno *screening de novo*, con il fine ultimo di identificare i composti che aumentano l'espressione di Glut1 per il trattamento di Glut1DS.

5.2 Cure sperimentali

Recentemente, c'è stata una tendenza verso lo studio della personalizzazione della terapia nello sviluppo di biomarcatori per una diagnosi il più precoce possibile e di applicare terapie mirate che possano correggere i deficit molecolari legate ai difetti genetici. È stato osservato che alcuni farmaci antiepilettici possono peggiorare le crisi convulsive, quindi è cruciale scegliere il trattamento più adatto per ogni paziente [63]. La variazione eterozigote in SLC2A1 e le mutazioni del gene determinano il fallimento del trasporto del glucosio, correlato all'insorgenza di Glut1DS; ciò, come discusso, influenza il trasporto del glucosio attraverso la barriera ematoencefalica e la sua disponibilità nel cervello [64]. Questa mutazione è il risultato dell'aplo-insufficienza del gene SLC2A e di una ridotta espressione dei suoi prodotti tradotti, incluso Glut1 [64]. I pazienti affetti mostrano bassi livelli di glucosio nel liquido cerebrospinale (CSF) e la ipoglicorrichia, è più comune in giovane età e si manifesta con crisi infantili resistenti ai farmaci antiepilettici convenzionali, stato epilettico non convulsivo prevalentemente in stato di digiuno, epilessia mioclonico-astatica, discinesia parossistica indotta dall'esercizio fisico, grave ritardo psicomotorio, caratteristiche distoniche, atassia,

ritardo dello sviluppo, microcefalia acquisita, ipotonia, spasticità e disturbi del movimento, nonché un'ampia pleiotropia fenotipica, inclusa disabilità intellettiva, disturbi del movimento ed epilessia resistente ai farmaci [64]. Esistono rare condizioni nelle epilessie genetiche generalizzate nelle mutazioni di SLC2A1, che si riscontrano nelle crisi di assenza ad esordio precoce (EOAE) prima dei quattro anni e, raramente, nell'epilessia giovanile classica [64]. Ciò può manifestarsi con una varietà di fenotipi, tra cui l'encefalopatia epilettica ad esordio precoce e l'epilessia con assenza refrattaria ad esordio nella prima infanzia [64]. Sebbene in alcuni studi le forme generalizzate di epilessia non fossero correlate alle mutazioni di SLC2A1, è stato riportato che le mutazioni di SLC2A1 in combinazione con disturbi del movimento associati, difficoltà motorie e/o del linguaggio possono riflettersi nell'epilessia generalizzata [64]. Come detto, quando la mancanza di ATP viene colmata, le funzioni cerebrali possono essere quasi completamente ripristinate, il che rende essenziale effettuare una diagnosi precoce e iniziare la dieta chetogenica il prima possibile [48]. L'epilessia correlata al *deficit* di GLUT-1 è associata a una scarsa risposta alla terapia farmacologica antiepilettica standard. Nei pazienti terapeutamente difficili con mutazioni SLC2A1, il beneficio della dieta chetogenica dovrebbe essere considerato anche nelle epilessie generalizzate. Nelle encefalopatie epilettiche infantili precoci (EIEE) e nelle epilessie gravi dell'infanzia, le mutazioni SLC2A1 sono rare e l'identificazione di questi pazienti per una terapia specifica inclusa la dieta chetogenica è un'importante strategia da implementare [65]. Le forme più lievi di epilessia dovute a *deficit* di Glut1 possono rispondere ai farmaci antiepilettici standard anche se attualmente non esistono farmaci approvati per Glut1DS. Tuttavia, quando non rispondono ai farmaci o convulsioni che sono tipicamente refrattarie ai trattamenti medici, la terapia standard di riferimento di questi pazienti include la KD, che contribuisce a trattare i sintomi della neuroglicopenia attraverso *bypass* nel trasporto difettoso del glucosio e fornitura di energia alternativa al sistema nervoso centrale [66]. Infatti, il rifornimento diretto di substrati energetici che alimentano il ciclo di Krebs rappresenta un meccanismo alternativo per ridurre l'attività convulsiva (Figura 8).

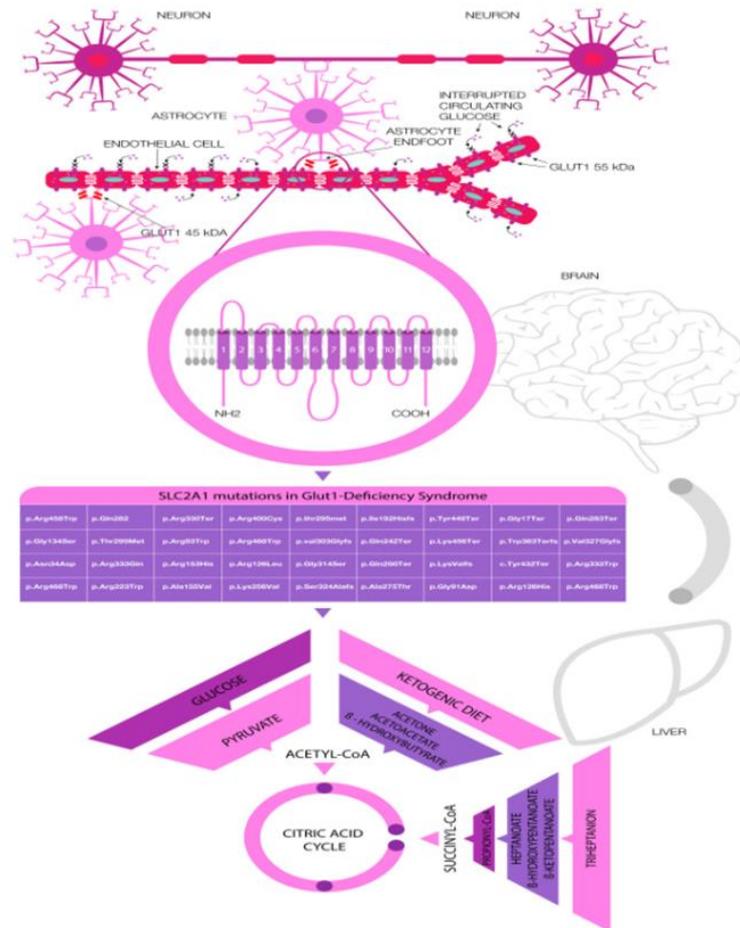


Figura 8: Disturbo del trasporto del glucosio attraverso la barriera ematoencefalica e la sua disponibilità nel cervello (rispettivamente astrociti e neuroni) causato dalla varietà di mutazioni nel SLC2A1, test genetici di varianti patogene e approcci terapeutici con fonti energetiche alternative. Fonte [66]

La logica del trattamento dei pazienti con Glut1DS è che la trieptanoina che è un substrato anaplerotico con i suoi prodotti metabolizzati tra cui eptanoato e corpi chetonici di composti di carbonio C4 e C5 attraversano facilmente la barriera ematoencefalica tramite trasportatori monocarbossilati e possono potenziare l'effetto dei chetoni regolari come un carburante alternativo per il cervello [66]. Per questo motivo, ci sono studi preclinici positivi condotti su Glut1DS correlati all'epilessia, e studi clinici in corso [66]. Un rapporto clinico ha dimostrato che la trieptanoina ha prodotto un miglioramento clinico del 90% nei pazienti Glut1DS con manifestazioni parossistiche non epilettiche precedentemente oggetto di disapprovazione o intolleranti alla KD [67]. Allo stesso modo, un altro studio condotto su pazienti Glut1DS ha mostrato una riduzione delle onde di picco sull'elettroencefalogramma dopo 90 minuti di trattamento con trieptanoina [67]. Tenendo conto di ciò, l'anaplerosi consente un migliore apporto di carboidrati e livelli di glucosio rispetto alla KD, senza esacerbazione del deficit di

trasporto del glucosio nel cervello, il che indica ulteriormente una promettente strategia terapeutica per il futuro, anche se sono necessari studi controllati più ampi. Tuttavia, le diete più flessibili, inclusa la Atkins modificata e gli inibitori dell'anidraasi carbonica come l'acetazolamide o la zonisamide, possono essere efficaci nei casi più lievi riducendo il controllo delle crisi, il miglioramento dei disturbi del movimento e la discinesia [66]. È necessario prestare particolare attenzione al trattamento aggiuntivo nei bambini che seguono una KD e ai farmaci antiepilettici aggiuntivi, tra cui fenobarbital, acido valproico che può provocare l'inibizione del trasporto Glut1 e l'inibizione della β -ossidazione degli acidi grassi, acetazolamide, topiramato e zonisamide, ed ai pazienti affetti da Glut1DS si consiglia di evitare i barbiturici specialmente nei bambini con convulsioni ad esordio infantile, caffeina e acido valproico a causa delle conseguenze cliniche impreviste della sua azione (Figura 9) [66].

Diet Treatment	Antiepileptic Drugs	Drug Combinations to Avoid with KD	Drugs to Avoid Due to GLUT1 Impairment
Ketogenic (gold standard)	Acetazolamide	Valproate	Phenobarbital, Valproate
Modified Atkins	Topiramate	Zonisamide	Tyrosine kinase inhibitors
Medium chain Triglycerides	Zonisamide	Acetazolamide	Caffeine, Ethanol
Low glycemic index treatment	Phenytoin	Topiramate	Diazepam, Narcotics
Triheptanoin (under investigation)	Carbamazepine	-	Tricyclic antidepressants
Alpha lipoic acid (under investigation)	-	-	General anaesthetics, Chloral hydrate
-	-	-	Guanosine triphosphate analogues

Figura 9: Attuali opzioni terapeutiche e precauzioni per il deficit di GLUT1 correlato all'epilessia. Fonte [68]

Ultimamente, numerosi studi si sono con entrati sulla terapia genica con l'idea di verificare se in modelli murini il gene codificante Glut1 esogeno posto nelle cellule neurali possa migliorare i livelli di glucosio nel liquido cerebrospinale, suggerendo che questa sarà una terapia umana efficace in futuro [66]. Come accennato, attualmente non esiste alcun trattamento per la sindrome da deficit di GLUT1 ma, fortunatamente, tuttavia, esistono trattamenti efficaci che aiutano a nutrire il cervello in crescita e possono prevenire e controllare molti sintomi. Abbiamo visto come la dieta chetogenica rappresenti il moderno *standard* di cura stimolando la produzione di corpi chetonici che, attraversando la barriera ematoencefalica, vengono utilizzati come fonte di energia dal cervello. In questo modo, la maggior parte delle crisi epilettiche può essere controllata efficacemente e i disturbi del movimento possono essere migliorati in circa due terzi dei pazienti con deficit di GLUT1. Tuttavia, continuare a seguire

una dieta ricca di proteine e grassi può portare a danni al fegato e ai reni, così come ad un probabile aumento di molti fattori di rischio riguardo alle malattie cardiovascolari.

CAPITOLO 6

COMPLICAZIONI

6.1 Farmaci e comportamenti da evitare

Come discusso nei capitoli precedenti, la KD rappresenta il *gold standard* per la terapia di pazienti Glut1DS. Per molti pazienti, la dieta può fornire un miglioramento immediato, anche se un beneficio maggiore si può osservare dopo un lungo periodo di trattamento. In questo contesto, al momento della diagnosi e nel corso della gestione del paziente, sono i medici a stabilire quali interventi sono adatti per ciascuna persona ed a prescrivere la terapia, sia nel dettaglio della dieta, sia nell'assunzione di eventuali farmaci, integratori e nella programmazione delle visite di *follow-up*. Per gestire al meglio dieta, farmaci e integratori e rendere tutte le cure il più tollerabili possibile, è necessaria una grande creatività e ogni famiglia trova le soluzioni più adeguate al paziente all'interno nella propria famiglia, scuola, comunità e ambiente di lavoro. Tuttavia, è sempre importante che tutto sia approvato da un'*equipe* medica che possa costantemente valutare e garantire un equilibrio tra dieta, integratori, crescita ed effetti collaterali [49]. Anche se, in molti casi, una persona si assume la maggior parte della gestione della propria dieta, è fondamentale non agire da soli e creare una rete di supporto. Innanzitutto, la famiglia, che deve collaborare per affrontare al meglio i momenti insieme, nel rispetto del paziente e anche di quello delle "tradizioni" familiari. Ad esempio, le cene in famiglia non devono necessariamente scomparire, ma si dovrebbero apportare temporaneamente piccoli cambiamenti alle tradizioni per consentire al paziente Glut1DS di ambientarsi e abituarsi alla nuova dieta. Se tutti sono informati si può sempre trovare un compromesso. Allo stesso tempo, la scuola richiederà la collaborazione di tutti e, spesso, è necessario confrontarsi con le paure ed i timori del personale scolastico per la grande responsabilità che questa dieta richiede [49]. È importante essere pazienti e cercare un compromesso per rassicurare tutti, soprattutto la persona affetta da questa sindrome. Inoltre, è importante riuscire a controllare e regolare tutto il mondo che circonda il paziente Glut1DS, come alimenti a portata di mano, dolci, cene e feste: tuttavia, per una corretta attuazione della dieta, soprattutto per i bambini piccoli, questo è un aspetto assolutamente necessario. Per condurre con successo una KD, la prima cosa da fare è preparare la casa, eliminando dolci, snack e altri alimenti, organizzare bene la cucina, eliminare i cibi che possono allettare il paziente. Sapendo quali sono le cose "più rischiose" per un paziente Glut1DS, è importante

cercare di prevedere e prevenire questi problemi con soluzioni pratiche e creative. Ciò vale anche per i pazienti adulti, ai quali si deve cercare di fornire un'assistenza specifica per limitare le tentazioni. Lo stile di vita dei pazienti Glut1DS non è facile da adattare, ed è necessario un atteggiamento positivo in famiglia nei confronti del cibo e della nutrizione per prevenire il rifiuto della dieta. L'ultima cosa da fare è "trasmettere" le esperienze personali e le ansie al paziente. È molto importante gestire la non voglia di mangiare determinati cibi per evitare di sacrificare la KD: naturalmente, è possibile che ci sia un primo rifiuto dei nuovi prodotti alimentari. È molto importante riuscire a far conoscere nuovi piatti e dare ai pazienti Glut1DS il tempo di abituarsi ai nuovi gusti. In questo senso, è possibile "lavorare" sulla presentazione: per un bambino si può creare un piatto in modo giocoso, disponendo il cibo in modo che si formi un disegno; Per un adulto è importante che il cibo venga presentato il più simile possibile ai piatti degli altri. Inoltre, può anche essere utile coinvolgere il paziente nella pianificazione e preparazione del pasto per fornire un senso di controllo [49]. Oltre al trattamento dietetico è importante evitare anche farmaci che possono influenzare negativamente il trasporto del glucosio come fenobarbitale, caffeina e diazepam. Infatti, l'acido valproico e il fenobarbitale utilizzati spesso come farmaci antiepilettici nelle crisi epilettiche, potrebbero peggiorare il trasporto del glucosio nei pazienti con Glut1DS [10]. Inoltre, è opportuno considerare che alcuni farmaci potrebbero contenere eccipienti a base di carboidrati, come aspartame, il sorbitolo o il mannitolo, che devono essere chiaramente indicati. Se non ci sono alternative valide, è possibile assumere tali farmaci, tenendo conto che la presenza di carboidrati nei rivestimenti delle compresse è di solito in quantità molto piccole e non ha un impatto significativo sulla dieta complessiva [10].

CONCLUSIONI

La crescente complessità di Glut1DS, sin dalla sua descrizione originale nel 1991, ha evidenziato la necessità di sviluppare un consenso di esperti basato su questionari, conferenze internazionali e tavole rotonde. Gli scienziati e i medici hanno convenuto che i segni clinici suggestivi di Glut1DS giustificano un tempestivo *iter* diagnostico. Una puntura lombare che permette di misurare adeguatamente il contenuto di glucosio nel liquor e l'analisi della sequenza genica di *SLC2A1* rimangono fondamentali per confermare una diagnosi di Glut1DS. Normoglicemia, ipoglicorrichia e una concentrazione di lattato nel liquido cerebrospinale da bassa a normale sono biomarcatori necessari per la valutazione. Come discusso anche in questa tesi, le KD rimangono lo *standard* di cura e rappresentano il miglior trattamento per le manifestazioni parossistiche di Glut1DS. La scelta della KD è influenzata da diversi fattori tra cui l'età del paziente e la tollerabilità [68]. Come visto, l'importanza della diagnosi e del trattamento precoci non può essere sopravvalutata. Nei casi classici di Glut1DS, la KD dovrebbe essere iniziata il prima possibile dopo la nascita mantenendo il più alto grado di chetosi per mitigare la carenza di energia cerebrale fornendo concentrazioni ottimali di combustibili metabolici al cervello in via di sviluppo. È meno chiaro se questa regola biologica si applichi ai fenotipi più lievi, ma l'esperienza con altre malattie genetiche suggerisce che sia così. La decelerazione della crescita della testa durante la prima infanzia è un segno inquietante di disfunzione cerebrale irreversibile [68]. Come previsto, sono sorte controversie a causa della mancanza di dati su questioni irrisolte riguardanti Glut1DS. I centri dove vengono presi in cura questi pazienti hanno dovuto sviluppare protocolli individuali che devono ancora essere modificati sulla base di questo consenso e di futuri studi di ricerca. I disaccordi ruotavano attorno a questioni di base come l'intervallo normale delle concentrazioni di glucosio nel liquido cerebrospinale, varianti *SLC2A1* di significato poco chiaro, membri della famiglia asintomatici con diagnosi di varianti *SLC2A1* e l'uso di KD nelle pazienti Glut1DS in gravidanza. Le decisioni terapeutiche sono meno chiare nelle varianti atipiche della Glut1DS, soprattutto nei pazienti oligosintomatici o ad esordio tardivo, a causa dell'esperienza limitata. Nonostante l'efficacia della KD, in Glut1DS esiste un bisogno insoddisfatto di terapie aggiuntive e nuovi approcci. I problemi terapeutici irrisolti riguardano l'uso concomitante di farmaci anticonvulsivanti, composti come acetazolamide, cannabidiolo, sali chetonici ed esteri chetonici, e il trattamento farmacologico di eventi parossistici, distonia e disartria che compromettono significativamente la qualità della vita dei pazienti. La transizione alla

medicina per adulti è, spesso, difficile per i pazienti e per i medici curanti. Non è chiaro per quanto tempo il trattamento dietetico dovrebbe essere continuato nella gestione della Glut1DS adulta, e come dovrebbero essere monitorati e affrontati gli effetti avversi a lungo termine [69]. La ricerca futura dovrà anche affrontare l'impatto della carenza di Glut1 su altri organi ricchi di trasportatori di Glut1 come cuore, muscoli, placenta e retina. Il riscontro di un'angiogenesi cerebrale compromessa durante lo sviluppo nei topi modello Glut1DS sottolinea l'importanza della diagnosi precoce e del trattamento proattivo per prevenire danni cerebrali irreversibili. Le future terapie per Glut1DS si concentreranno su combustibili metabolici cerebrali supplementari, trasferimento di *SLC2A1* e piccole molecole progettate per migliorare l'espressione o l'attività di Glut1 [70]. In conclusione, esaurire le riserve energetiche del cervello è chiaramente dannoso per la salute dell'individuo. Tuttavia, le precise conseguenze molecolari e cellulari della deprivazione di glucosio nel cervello devono ancora essere completamente definite. Gli studi sulla deprivazione di energia cerebrale nella Glut1DS stanno iniziando a gettare luce utile sulla patologia associata alla più ampia famiglia delle sindromi da insufficienza energetica cerebrale. Inoltre, gli sforzi per reintegrare il Glut1 nella Glut1DS potrebbero rivelarsi utili oltre il trattamento di questa rara malattia. È noto che almeno altre due condizioni, la retinite pigmentosa e il morbo di Alzheimer, coinvolgono bassi livelli di Glut1 [71]. Approfondimenti sulla deprivazione di energia cerebrale derivanti dallo studio di Glut1DS, combinati con gli sforzi per sviluppare strategie terapeutiche basate su Glut1 per questo disturbo dello sviluppo neurologico relativamente raro, potrebbero diventare sempre più rilevanti per il trattamento della famiglia allargata di disturbi che coinvolgono questo glucotrasportatore.

BIBLIOGRAFIA

1. Klepper J. GLUT1 deficiency syndrome in clinical practice. *Epilepsy Res.* 2012 Jul;100(3):272-7.
2. De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N Engl J Med.* 1991 Sep 5;325(10):703-9.
3. Lopez-Rivera JA, Perez-Palma E, Symonds J, Lindy AS, McKnight DA, Leu C, et al. A catalogue of new incidence estimates of monogenic neurodevelopmental disorders caused by de novo variants. *Brain.* 2020;143(4):1099–105
4. Lizák B, Szarka A, Kim Y, Choi KS, Németh CE, Marcolongo P, Benedetti A, Bánhegyi G, Margittai É. Glucose Transport and Transporters in the Endomembranes. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 24;20(23):5898. doi: 10.3390/ijms20235898. PMID: 31771288; PMCID: PMC6929180.
5. Klepper J, Akman C, Armeno M, Auvin S, Cervenka M, Cross HJ, De Giorgis V, Della Marina A, Engelstad K, Heussinger N, Kossoff EH, Leen WG, Leiendecker B, Monani UR, Oguni H, Neal E, Pascual JM, Pearson TS, Pons R, Scheffer IE, Veggiotti P, Willemsen M, Zuberi SM, De Vivo DC. Glut1 Deficiency Syndrome (Glut1DS): State of the art in 2020 and recommendations of the international Glut1DS study group. *Epilepsia Open.* 2020 Aug 13;5(3):354-365.
6. Wang D, Pascual JM, De Vivo D. Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome. 2002 Jul 30 [updated 2018 Mar 1]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. PMID: 20301603.
7. Wolking S, Becker F, Bast T, Wiemer-Kruel A, Mayer T, Lerche H, et al. Focal epilepsy in Glucose transporter type 1 (Glut1) defects: case reports and a review of literature. *J. Neurol.* 2014;261(10):1881–6.
8. Larsen J, Johannesen KM, Ek J, Tang S, Marini C, Blichfeldt S, et al. The role of SLC2A1 mutations in myoclonic astatic epilepsy and absence epilepsy, and the estimated frequency of GLUT1 deficiency syndrome. *Epilepsia.* 2015;56(12):e203–8.
9. Weber YG, Kamm C, Suls A, Kempfle J, Kotschet K, Schule R, et al. Paroxysmal choreoathetosis/spasticity (DYT9) is caused by a GLUT1 defect. *Neurology.* 2011;77(10):959–64.
10. Pearson TS, Akman C, Hinton VJ, Engelstad K, De Vivo DC. Phenotypic spectrum of glucose transporter type 1 deficiency syndrome (Glut1 DS). *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(4):342
11. Pons R, Collins A, Rotstein M, Engelstad K, De Vivo DC. Lo spettro dei disturbi del movimento nella carenza di Glut-1. *Disordine mov.* 2010; 25 (3): 275–81.
12. De Giorgis V, Veggiotti P. GLUT1 deficiency syndrome 2013: current state of the art. *Seizure.* 2013 Dec;22(10):803-11.
13. Leen WG, de Wit CJ, Wevers RA, van Engelen BG, Kamsteeg EJ, Klepper J, et al. Child neurology: differential diagnosis of a low CSF glucose in children and young adults. *Neurology.* 2013;81(24):e178–81
14. Joerg Klepper, GLUT1 deficiency syndrome in clinical practice, *Epilepsy Research*, Volume 100, Issue 3, 2012, Pages 272-277, ISSN 0920-1211
15. Pawlik W, Okulewicz P, Pawlik J, Krzywińska-Zdeb E. Diagnostic and Clinical Manifestation Differences of Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome in a Family with SLC2A1 Gene Mutation. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Mar 10;19(6):3279.
16. Klepper J, Garcia-Alvarez M, O'Driscoll KR, Parides MK, Wang D, Ho YY, De Vivo DC. Erythrocyte 3-O-methyl-D-glucose uptake assay for diagnosis of glucose-transporter-protein syndrome. *J Clin Lab Anal.* 1999b;13:116–21.
17. Leary LD, Wang D, Nordli DR Jr, Engelstad K, De Vivo DC. Seizure characterization and electroencephalographic features in Glut-1 deficiency syndrome. *Epilepsia.* 2003;44(5):701–7.
18. Prospective Multicenter Validation of a Simple Blood Test for the Diagnosis of Glut1 Deficiency Syndrome; Fanny Mochel, Domitille Gras, Marie Pierre Luton, Manon Nizou, Donatella Giovannini, Caroline Delattre, Mélodie Aubart, Maga ie Barth, Anne De Saint-Martin, Diane Doummar, Nouha Essid, Alexa Garros, Caroline Hachon Le Camus, Celia Hoebeke, Sylvie Nguyen The Tich, Maximilien Perivier, Serge Rivera, Anne Rolland, Agathe Roubertie, Catherine Sarret, Caroline Sevin, Dorothee Ville, Marc Sitbon, Jean-Marc Costa, Roser Pons, Angels Garcia Cazorla, Sandrine Vuillaumier, Vincent Petit, Odile Boespflug-Tanguy, Darryl C. De Vivo, for the MetaGlut1 Study Group *Neurology Jun 2023, 100 (23) e2360-e2373*
19. Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Leferink M, Hofste T, van Engelen BG, et al. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain.* 2010;133(Pt 3):655–70.
20. Tayebi N, Leon-Ricardo B, McCall K, Mehinovic E, Engelstad K, Huynh V, Turner TN, Weisenberg J, Thio LL, Hruz P, Williams RSB, De Vivo DC, Petit V, Haller G, Gurnett CA. Quantitative determination of SLC2A1 variant functional effects in GLUT1 deficiency syndrome. *Ann Clin Transl Neurol.* 2023 May;10(5):787-801. doi: 10.1002/acn3.51767. Epub 2023 Mar 31. PMID: 37000947; PMCID: PMC10187726.
21. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med.* 2013 Apr-Jun;34(2-3):121-38.

22. Ismail A, Tanasova M. Importance of GLUT Transporters in Disease Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 4;23(15):8698.
23. Oran Kwon P.E., Chen S., Corpe C., Lee J.H., Kruhlak M., Levine M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 2007;21:366–377. doi: 10.1096/fj.06-6620com.
24. Maher F., Davies-Hill T.M., Lysko P.G., Henneberry R.C., Simpson I.A. Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Mol. Cell. Neurosci.* 1991;2:351–360. doi: 10.1016/1044-7431(91)90066-W.
25. Wu X.H., Freeze H.H. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics.* 2002;80:553–557. doi: 10.1006/geno.2002.7010.
26. Wu X.H., Freeze H.H. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics.* 2002;80:553–557. doi: 10.1006/geno.2002.7010.
27. Li Q., Manolescu A., Ritzel M., Yao S., Slugoski M., Young J.D., Chen X.Z., Cheeseman C.I. Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004;287:G236–G242. doi: 10.1152/ajpgi.00396.2003.
28. Gawlik V., Schmidt S., Scheepers A., Wennemuth G., Augustin R., Aumuller G., Moser M., Al-Hasani H., Kluge R., Joost H.G., et al. Targeted disruption of Slc2a8 (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. *Mol. Membr. Biol.* 2008;25:224–235. doi: 10.1080/09687680701855405.
29. Rogers S., Docherty S.E., Slavin J.L., Henderson M.A., Best J.D. Differential expression of GLUT12 in breast cancer and normal breast tissue. *Cancer Lett.* 2003;193:225–233. doi: 10.1016/S0304-3835(03)00010-7.
30. Uldry M., Ibberson M., Horisberger J.D., Chatton J.Y., Riederer B.M., Thorens B. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* 2001;20:4467–4477. doi: 10.1093/emboj/20.16.4467
31. Vulturar R, Chiş A, Pintilie S, Farcaş IM, Botezatu A, Login CC, Sitar-Taut AV, Orasan OH, Stan A, Lazea C, Al-Khrouz C, Mager M, Vinţan MA, Manole S, Damian L. One Molecule for Mental Nourishment and More: Glucose Transporter Type 1-Biology and Deficiency Syndrome. *Biomedicines.* 2022 May 26;10(6):1249.
32. Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature.* 2014 Jun 5;510(7503):121-5.
33. Stafstrom CE, Rho JM. The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Front. Pharmacol.* 2012; 3, 59.
34. Cervenka M. Metabolism-based therapies for epilepsy: New directions for future cures. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2021; 8, 1730–1737.
35. Marin-Valencia I, Roe CR, Pascual JM. Pyruvate carboxylase deficiency: Mechanisms, mimics and anaplerosis. *Mol. Genet. Metab.* 2010; 101, 9–17.
36. Tzadok M, Nissenkorn A, Porper K, Matot I, Marcu S, Anikster Y, et al. The many faces of glut1 deficiency syndrome. *J Child Neurol.* 2014;29(3):349–59.
37. Paoli A. Ketosis, ketogenic diet and food intake control: a complex relationship. *Front Psychol.* 2015; 6: 27.
38. Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV Jr, de Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science.* 2013;339:211–214.
39. Xie Z, Zhang D, Chung D, Tang Z, Huang H, Dai L, Qi S, Li J, Colak G, Chen Y, Xia C, Peng C, Ruan H, Kirkey M, Wang D, Jensen LM, Kwon OK, Lee S, Pletcher SD, Tan M, Lombard DB, White KP, Zhao H, Li J, Roeder RG, Yang X, Zhao Y. Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine β -Hydroxybutyrylation. *Mol Cell.* 2016;62:194–206.
40. Pirola L, Balcerczyk A, Tothill RW, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, Ziemann M, Karagiannis T, Tonna S, Kowalczyk A, Beresford-Smith B, Macintyre G, Kelong M, Hongyu Z, Zhu J, El-Osta A. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia-regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome Res.* 2011;21:1601–1615.
41. Klepper J, Leidecker B. Glut1 deficiency syndrome and novel ketogenic diets. *J Child Neurol.* 2013;28(8):1045–8.
42. Kim DW, Kang HC, Park JC, Kim HD. Benefits of the nonfasting ketogenic diet compared with the initial fasting ketogenic diet. *Pediatrics.* 2004;114:1627–30.
43. Kossoff EH, McGrogan JR, Bluml RM. A modified Atkins diet is effective for the treatment of intractable pediatric epilepsy. *Epilepsia.* 2006;47:421–4
44. Pfeifer HH, Thiele EA. Low-glycemic-index treatment: a liberalized ketogenic diet for treatment of intractable
45. Kossoff EH, Freeman JM, Turner Z, Rubenstein JE. Ketogenic diets: treatments for epilepsy and other disorders. 5th ed. New York NY: Demos Medical; 2011.
46. Pong AW, Geary BR, Engelstad KM, Natarajan A, Yang H, De Vivo DC. Glucose transporter type I deficiency
47. Urbizu A, Cuenca-Leon E, Raspall-Chaure M, Gratacòs M, Conill J, Redecillas S, et al. Paroxysmal exercise-induced dyskinesia, writer's cramp, migraine with aura and absence epilepsy in twin brothers with a novel SLC2A1 missense mutation. *J Neurol Sci.* 2010;295:110–3.

48. Ito S, Oguni H, Ito Y, Ishigaki K, Ohinata J, Osawa M. Modified Atkins diet therapy for a case with glucose transporter type 1 deficiency syndrome. *Brain Dev.* 2008;30:226–8.
49. Klepper J. Glucose transporter deficiency syndrome (GLUT1 DS) and the ketogenic diet. *Epilepsia* 2008;49(Suppl 8):46–9.
50. Wojtala M, Pirola L, Balcerczyk A. Modulation of the vascular endothelium functioning by dietary components, the role of epigenetics. *Biofactors.* 2017;43:5–16.
51. Batch JT, Lamsal SP, Adkins M, Sultan S, Ramirez MN. Advantages and Disadvantages of the Ketogenic Diet: A Review Article. *Cureus.* 2020 Aug 10;12(8):e9639. doi: 10.7759/cureus.9639. PMID: 32923239; PMCID: PMC7480775.
52. Hahn TJ, Halstead LR, DeVivo DC. Disordered mineral metabolism produced by ketogenic diet therapy. *CalcifTissue Int* 1979;28:17–22.
53. Bertoli S, Trentani C, Ferraris C, De Giorgis V, Veggiotti P, Tagliabue A. Long-term effects of a ketogenic diet on body composition and bone mineralization in GLUT-1 deficiency syndrome: A case series.
54. Cervenka MC, Patton K, Eloyan A, Henry B, Kossoff EH. The impact of the modified Atkins diet on lipid profiles in adults with epilepsy. *Nutr Neurosci.* 2016; 19: 131-137
55. Heussinger N, Della Marina A, Beyerlein A, Leiendecker B, Hermann-Alves S, Dalla Pozza R, Klepper. 10 patients, 10 years - Long term follow-up of cardiovascular risk factors in Glut1 deficiency treated with ketogenic diet therapies: A prospective, multicenter case series. *J. Clin Nutr.* 2018 Dec;37(6 Pt A):2246-2251.
56. Klepper J, Fischbarg J, Vera JC, Wang D, De Vivo DC. GLUT1- deficiency: barbiturates potentiate haploinsufficiency in vitro. *Pediatr Res.* 1999;46(6):677–83.
57. Anheim M, Maillart E, Vuillaumier-Barrot S, Flamand-Rouvière C, Pineau F, Ewencyk C, et al. Excellent response to acetazolamide in a case of paroxysmal dyskinesias due to GLUT1-deficiency. *J Neurol.* 2011;258:316–7
58. Mochel F, DeLonlay P, Touati G, Brunengraber H, Kinman RP, Rabier D, et al. Pyruvate carboxylase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Mol Genet Metab.* 2005;84(4):305–12.
59. Deng S, Zhang GF, Kasumov T, Roe CR, Brunengraber H. Interrelations between C4 ketogenesis, C5 ketogenesis, and anaplerosis in the perfused rat liver. *J BiolChem.* 2009;284(41):27799–807.
60. Lee SY, Abel ED, Long F. Glucose metabolism induced by Bmp signaling is essential for murine skeletal development. *Nat Commun* 2018;9:4831.
61. Buller CL, Loberg RD, Fan MH, et al. A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C836–C843.
62. Farrell CL, Pardridge WM. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5779–5783.
63. Walker LE, Mirza N, Yip VLM, Marson AG, Pirmohamed M. Personalized medicine approaches in epilepsy. *J. Intern. Med.* 2015, 277, 218–234.
64. Balestrini S, Sisodiya SM. Pharmacogenomics in epilepsy. *Neurosci. Lett.* 2016.
65. Weber YG, Biskup S, Helbig KL, Von Spiczak S, Lerche H. The role of genetic testing in epilepsy
66. Daci A, Bozalija A, Jashari F, Krasniqi S. Individualizing Treatment Approaches for Epileptic Patients with Glucose Transporter Type1 (GLUT-1) Deficiency. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 5;19(1):122. doi: 10.3390/ijms19010122. PMID: 29303961; PMCID: PMC5796071.
67. Vockley J, Burton B, Berry GT, Longo N, Phillips J, Sanchez-Valle A, Tanpaiboon P, Grunewald S, Murphy E, Humphrey R. UX007 for the treatment of long chain-fatty acid oxidation disorders: Safety and efficacy in children and adults following 24 weeks of treatment. *Mol. Genet. Metab.* 2017.
68. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Auvin S, Ballaban-Gil KR, Christina Bergqvist AG, Blackford R, et al. Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy: updated recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia Open.* 2018;3(2):175–92.
69. Marin-Valencia I, Good LB, Ma Q, Malloy CR, Pascual JM. Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(2):175–82
70. Tang M, Park SH, De Vivo DC, Monani UR. Therapeutic strategies for glucose transporter 1 deficiency syndrome. *Ann Clin TranslNeurol.* 2019;6(9):1923–32.
71. Ait-Ali N, Fridlich R, Millet-Puel G, et al. Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis. *Cell.* 2015;161(4):817-832.

LISTA ABBREVIAZIONI

1. (GLUT1) Glucose Transporter Type 1
2. (GLUT1 DS) Glucose Transporter Type1 Deficiency Syndrome
3. (EEG) Elettroencefalogramma
4. (RM) Risonanza magnetica
5. (TC) Tomografia computerizzata
6. (ATP) Adenosina Trifosfato
7. (PET) Tomografia a emissione di positroni
8. (CE) Marcatura Comunità Europea
9. (EDTA) Acido etilendiamminotetracetico
10. (DNA) Acido desossiribonucleico
11. (RNA) Acido ribonucleico
12. (HMIT) H⁺ -myo- inositol transporter
13. (2-DOG) 2-desossi-D-glucosio
14. (3-OMG) 3-O-metil-D-glucosio
15. (BBB) Barriera ematoencefalica
16. (MCT) Monocarboxylate transporter
17. (MFS) Superfamiglia dei Maggiori Facilitatori
18. (SP) Sugar Porters
19. (TM) Transmembrane Domains
20. (ICH) Intracellular Helices
21. (β -NG) n-nonil- β -D-glucopiranoside
22. (KD) Ketogenic Diet
23. (Acetil CoA) Acetil-coenzima A
24. (TCA) Tricarboxylic acid cycle
25. (BHB) β -idrossibutirrato
26. (AcAc) Acetoacetato
27. (PTM) Modificazioni post-traduzionali
28. (EC) Cellule endoteliali vascolari
29. (MAD) Dieta Atkins Modificata
30. (LGIT) Dieta a basso indice glicemico
31. (PED) Discinesia parossistica

32. (AE) Adverse Events
33. (BMC) Contenuto Minerale Osseo
34. (CIMT) Parete intima carotidea
35. (SDS) Punteggio di deviazione standard
36. (BMI) Indice di massa corporea
37. (HDL) High Density Lipoprotein
38. (LDL) Low Density Lipoprotein
39. (TG) Trigliceridi
40. (AED) Farmaci antiepilettici
41. (IGF-1R) Fattore di crescita insulino-simile 1
42. (GAIP) G- α -interacting protein
43. (FCF21) Fattore di crescita delle fibre muscolari 21
44. (SRF) Serum Response Factor
45. (CSF) Liquido cerebrospinale
46. (EOAE) Crisi di assenza ad esordio precoce
47. (EIEE) Encefalopatie epilettiche infantili precoci

