



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

SCUOLA DI MEDICINA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASLAZIONALE

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina e Chirurgia

Tesi di Laurea

**STUDIO ANATOMO-CLINICO E ULTRASTRUTTURALE DI UN
RARO CASO DI CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA AD
ESORDIO NEONATALE**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Renzo Luciano BOLDORINI



Firmato digitalmente da Renzo Luciano
Boldorini
Data: 20.06.2024 12:14:04 CEST
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DEL PIEMONTE ORIENTALE/01943490027

Candidato:

Stefano MARCONE

Matricola 20028041

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1.INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1 CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA PEDIATRICA | 1 |
| 1.1.1 EVOLUZIONE DELLA HCM | 3 |
| 1.1.2 CAUSE GENETICHE DI HCM..... | 4 |
| 1.2 LE MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE | 6 |
| 1.2.1 FISIOPATOLOGIA..... | 7 |
| 1.2.2 EPIDEMIOLOGIA | 8 |
| 1.2.3 CLASSIFICAZIONE | 9 |
| 1.3 LE GLICOGENOSI | 11 |
| 1.3.1 EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAZIONE | 11 |
| 1.4 LA MALATTIA DI POMPE | 14 |
| 1.4.1 DEFINIZIONE | 14 |
| 1.4.2 FISIOPATOLOGIA | 14 |
| 1.4.3 EPIDEMIOLOGIA E SCREENING..... | 15 |
| 1.4.4 CLASSIFICAZIONE | 16 |
| 1.4.5 CLINICA INFANTILE ONSET POMPE DISEASE | 17 |
| 1.4.6 DIAGNOSI | 19 |
| 1.6.1 DIAGNOSI DIFFERENZIALE..... | 23 |
| 1.4.7 TERAPIA..... | 24 |
| 2. OBIETTIVI DELLO STUDIO | 26 |
| 3.PAZIENTE E METODI..... | 27 |
| 3.1 STORIA CLINICA..... | 27 |
| 4.DISCUSSIONE..... | 52 |
| 5.CONCLUSIONE | 55 |
| 6.BIBLIOGRAFIA..... | 56 |
| 7.RINGRAZIAMENTI..... | 60 |

1.INTRODUZIONE

1.1 CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA PEDIATRICA

La cardiomiopatia ipertrofica (HCM), è definita generalmente come una condizione caratterizzata da un'ipertrofia inspiegabile del ventricolo sinistro associata a camere ventricolari non dilatate, in assenza di altre malattie cardiache o sistemiche che potrebbero causare un'ipertrofia di tale entità nel paziente. È importante notare che i pazienti con un genotipo positivo possono non mostrare fenotipi evidenti di ipertrofia. Clinicamente, la HCM è riconosciuta quando lo spessore massimo della parete del ventricolo sinistro è pari o superiore a 15 mm, basandosi sull'ecocardiografia, con valori tra 13 e 14 mm considerati borderline, specialmente se accompagnati da una storia familiare di HCM. Le misurazioni dello spessore della parete del ventricolo sono, dunque, principalmente eseguite tramite ecocardiografia, sebbene la risonanza magnetica cardiaca sia utilizzata sempre più frequentemente.

Nei bambini, uno spessore aumentato della parete del ventricolo sinistro è definito come uno spessore superiore a 2 deviazioni standard sopra la media (z score ≥ 2) per età, sesso o dimensioni corporee. Inoltre, sebbene siano stati riportati vari modelli e distribuzioni di ipertrofia del ventricolo nella HCM, circa un terzo dei pazienti presenta un ispessimento segmentario della parete che coinvolge solo una piccola porzione del ventricolo sinistro, e questi pazienti di solito hanno una massa ventricolare sinistra calcolata normale. La diagnosi clinica di HCM può essere supportata da altre caratteristiche tipiche, come una storia familiare della malattia, sintomi cardiaci, tachiaritmie o anomalie elettrocardiografiche.

La diagnosi differenziale della HCM e di altre condizioni cardiache (con ipertrofia del VS) può spesso includere malattie cardiache ipertensive e il rimodellamento fisiologico associato all'allenamento atletico ("cuore d'atleta"). Questi scenari clinici non sono rari, e la confusione tra lievi espressioni morfologiche della HCM e altre condizioni con ipertrofia si verifica solitamente quando lo spessore massimo della parete è tra 13 e 15 mm. La probabilità di HCM può essere determinata dall'identificazione di una mutazione sarcomerica diagnostica

o dedotta da uno spessore significativo del ventricolo (≥ 25 mm) e/o dall'ostruzione del tratto di efflusso con movimento anteriore sistolico e contatto mitrale-settale. Quella descritta fino ad ora è dunque la definizione propria di cardiomiopatia ipertrofica, definita primaria o idiopatica.

È evidente che i disordini metabolici o infiltrativi di accumulo con ipertrofia dei ventricoli in neonati, bambini e giovani adulti possono imitare clinicamente la HCM (causata invece, soprattutto, da mutazioni delle proteine sarcomeriche), come le malattie mitocondriali, la malattia di Fabry. L'uso del termine HCM non è appropriato per descrivere questi pazienti con ipertrofia cardiaca che si può verificare anche nel contesto di altri disordini multisistemici come la sindrome di Noonan (con malformazioni craniofacciali e cardiache congenite, oltre a ipertrofia cardiaca causata da mutazioni nei geni della via RAS), o cardiomiopatie distinte come la malattia di Pompe, una malattia da accumulo di glicogeno, con debolezza muscolare scheletrica e cardiomiopatia causata da una carenza di α -1,4-glicosidasi.¹

Solitamente queste patologie predispongono ad un interessamento totale del muscolo cardiaco, inducendo ipertrofia non solo nel ventricolo sinistro, ma possibilmente in entrambi e, inoltre, sono presenti e rilevabili altri segni e sintomi sistemici propri della malattia, seppur solitamente sfumati. Una corretta caratterizzazione dell'ispessimento del cuore può dunque già indirizzare ad un ventaglio di possibili diagnosi, soprattutto se accompagnata da sintomi e segni suggestivi.

Sarebbe dunque corretto identificare questo enorme gruppo di patologie come cardiomiopatia ipertrofica secondaria, additando, dunque, la patologia o sindrome sistemica come causa della cardiomiopatia e identificando, invece, come cardiomiopatia ipertrofica idiopatia o primitiva (HCM) la patologia distinta da un esclusivo interessamento dell'organo cardiaco, in buona parte determinata da mutazioni geniche riguardanti le proteine sarcomeriche. L'indagine genetica è dunque determinante in questi casi per raggiungere la diagnosi corretta ed impostare il giusto trattamento.²

Il caso presentato in questo studio offre una valida prospettiva di quanto il corretto inquadramento diagnostico di questa condizione sia complicato. La nostra paziente, inizialmente identificata come possibilmente affetta da malattia di Pompe, a seguito di una accurata indagine genetica, quest'ultima, non si è rivelata la diagnosi corretta, nonostante

come vedremo il quadro clinico, laboratoristico, istopatologico e ultrastrutturale siano fortemente suggestivi di un quadro di glicogenosi di tipo 2.

1.1.1 EVOLUZIONE DELLA HCM

La cardiomiopatia ipertrofica primitiva è una malattia del muscolo cardiaco che si presenta con una variabilità di sintomi e decorso nel tempo, colpendo persone di tutte le età, dai neonati agli anziani. La maggior parte degli individui affetti ha una normale aspettativa di vita senza limitazioni o necessità di interventi medici importanti. Tuttavia, in alcuni pazienti l'HCM può causare complicazioni gravi, con il rischio di progressione della malattia o morte prematura.¹

In caso di complicazioni significative, l'HCM può seguire tre vie di progressione clinica distinte, seppur non esclusive:

1. Morte cardiaca improvvisa: causata da tachicardia ventricolare imprevedibile, che si verifica più frequentemente in giovani pazienti asintomatici sotto i 35 anni. Per la prevenzione primaria o secondaria in pazienti con fattori di rischio, si utilizzano i defibrillatori cardiaci impiantabili.
2. Insufficienza cardiaca: caratterizzata da affanno durante lo sforzo (con o senza dolore toracico), che può progredire nonostante una funzione sistolica conservata e un ritmo sinusale normale. In una piccola percentuale di casi, l'insufficienza cardiaca può evolvere in fase terminale con rimodellamento del ventricolo sinistro e disfunzione sistolica dovuta a un'estesa cicatrizzazione del miocardio. L'insufficienza cardiaca viene trattata con farmaci appropriati per controllare i sintomi. Nei casi più severi con sintomi persistenti, si può arrivare al trapianto di cuore.
3. Fibrillazione atriale: che può essere parossistica o cronica, associandosi a vari gradi di insufficienza cardiaca e aumentando il rischio di tromboembolia sistemica, ictus fatali e non fatali. La FA viene trattata con farmaci o, in alcuni casi, con ablazione con radiofrequenze.¹

1.1.2 CAUSE GENETICHE DI HCM

La cardiomiopatia ipertrofica primitiva è spesso causata, come precedentemente detto, da mutazioni genetiche che alterano le proteine del sarcomero, la struttura contrattile del muscolo cardiaco. Esso è costituito da filamenti spessi di miosina, proteine leganti la miosina e filamenti sottili di actina. La maggior parte delle mutazioni patogenetiche (geni di β -miosina, α -tropomiosina, troponina T cardiaca, MYBPC, MYL2, MYL3, TNNI3 e actina α cardiaca) codificano per le proteine di uno di questi filamenti. La forma ad insorgenza pediatrica ha una prevalenza di varianti genetiche più alta rispetto alla forma insorgente in età adulta. Oltre alle mutazioni che interessano direttamente le proteine del sarcomero, recenti ricerche hanno scoperto che anche varianti genetiche non codificanti possono giocare un ruolo nello sviluppo della patologia. Queste varianti non codificano per proteine, ma regolano l'espressione dei geni che codificano per le proteine del sarcomero o per altre proteine coinvolte nella funzione cardiaca. Studi su modelli animali hanno dimostrato che queste varianti non codificanti possono influenzare la dimensione e la funzione del ventricolo sinistro, contribuendo allo sviluppo della patologia

In sintesi, la HCM è una malattia cardiaca complessa causata da una combinazione di fattori genetici e ambientali. Le mutazioni genetiche che interessano le proteine del sarcomero e i geni regolatori rappresentano i principali fattori di rischio per lo sviluppo della malattia.³

Tuttavia, circa la metà dei pazienti che soddisfano i criteri diagnostici per la HCM e si sottopongono a test genetici risultano negativi alle mutazioni nei geni inclusi nei pannelli. Grazie all'ampliamento di questi ultimi è stato possibile identificare nuove mutazioni associate all'HCM, in diversi geni che codificano per i miofilamenti e per altre proteine. Seppur rari, esistono casi che suggeriscono che le mutazioni nei geni codificanti per le proteine che regolano il calcio contribuiscano alla patogenesi, come ad esempio i geni codificanti per la sorcina (SRI), calsequestrina 2 (CASQ2), troponina C1 (TNNC1) e recettore della rianodina 2 (RYR2). Ad eccezione di un numero limitato di mutazioni del gene TNNC1, l'HCM associata a alterazioni in questi geni non è stata ancora ampiamente caratterizzata.

Concentrando la nostra attenzione sul recettore RYR2 si apprende che negli ultimi 20 anni, sono state identificate quasi 200 mutazioni di quest'ultimo in pazienti con tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica, una malattia caratterizzata da gravi aritmie ventricolari scatenate dallo stress, ma senza alterazioni strutturali del miocardio. Più recentemente, è stata segnalata una mutazione RyR2, T1107M, in una famiglia con cardiomiopatia ipertrofica. Questa mutazione ha suscitato notevole interesse nel campo, poiché era la prima variante di RyR2 potenzialmente in grado di contribuire a un disturbo strutturale piuttosto che a un disturbo esclusivamente funzionale. La proteina ricombinante A1107M, l'analogo murino, si è comportata in modo notevolmente diverso in un sistema di espressione eterologa rispetto ad altre mutazioni riscontrate nella tachicardia ventricolare polimorfica, suggerendo un meccanismo patogenetico differente. Nel complesso, questi dati indicano che una mutazione di RyR2 può produrre un'ampia gamma di disfunzioni cardiache, ma il legame con una cardiomiopatia strutturale rimane sfuggente.⁴

Nel 2019 Alvarado et al hanno inoltre studiato la mutazione P1124L di RYR2, rilevata in un paziente con cardiomiopatia ipertrofica ostruttiva. Essi attraverso il loro studio, effettuato anche su modello murino, proponevano una possibile associazione tra questo tipo di mutazione ed il disturbo strutturale del cuore noto come HCM, proponendo dunque una concreta associazione non solo con i disturbi funzionali cardiaci.⁴

1.2 LE MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE

Dalla trattazione precedente traiamo dunque la conclusione che la cardiomiopatia ipertrofica può essere essenzialmente classificata come primaria o secondaria. Queste due entità, in realtà, sono solitamente difficili da distinguere solo da un punto di vista clinico, potendosi presentare con quadri spesso simili e sfumati. L'identificazione della corretta eziologia è però fondamentale per quanto riguarda l'avvio di un trattamento specifico.

Trattiamo ora più approfonditamente la malattia di Pompe, e in generale le malattie da accumulo lisosomiale, in quanto importante causa di cardiomiopatia ipertrofica secondaria ad esordio infantile e, inoltre, principale patologia sospettata per la paziente del caso clinico presentato.

La malattia di Pompe è una patologia genetica rara, inserita nel gruppo delle malattie da accumulo lisosomiale e, più specificatamente all'interno delle glicogenosi. Questa patologia porta ad un difetto nel metabolismo del glicogeno causando, soprattutto nella sua forma neonatale, una cardiomiopatia ipertrofica di tipo metabolico. Altri esempi di malattie da accumulo lisosomiale e glicogenosi (citiamo ad esempio la Malattia di Danon, la malattia di Cori e la malattia di Andersen) possono portare, seppur più raramente, ad un quadro di questo genere, per cui, anche queste ultime devono essere inserite nel ventaglio di diagnosi differenziali nei quadri più sospetti. Sarà poi l'insieme dei segni e sintomi e delle successive indagini più approfondite a guidare verso la patologia più probabile.

1.2.1 FISIOPATOLOGIA

Modificazioni, derivate essenzialmente da meccanismi genetici, a livello delle idrolasi, dei cofattori o delle proteine integrali di membrana possono causare patologia. In particolare, le mutazioni geniche che possono coinvolgere queste proteine vanno a determinare una riduzione della loro attività o una loro completa assenza, dando luogo a due principali meccanismi patologici.

In primo luogo, il catabolismo del substrato dell'enzima carente non potrà avvenire o avverrà in modo incompleto, provocando così l'accumulo di sostanze parzialmente o completamente non degradate all'interno dei lisosomi stessi, fenomeno noto come "accumulo primario". I lisosomi, riempiti di queste molecole, si ingrandiscono e diventano più numerosi a causa dell'adattamento. Essi regolano infatti la loro attività in base ai segnali provenienti dalla cellula: un aumento del flusso di macromolecole endocitate o fagocitate promuove la loro attivazione, con modifiche nella loro distribuzione, nelle dimensioni e nel loro numero. Al contrario, il segnale di inattivazione deriva dall'accumulo di cataboliti nella cellula.⁵

I lisosomi diventano quindi così grandi e numerosi da interferire con le normali funzioni cellulari.

Inoltre, si può osservare quello che viene definito "accumulo secondario". La funzione dei lisosomi è infatti fondamentale anche per la degradazione degli organelli invecchiati, in particolar modo dei mitocondri. L'assenza di questa funzione porta all'accumulo di mitocondri disfunzionali che andrà ad innescare la produzione di radicali liberi e l'apoptosi.

Complessivamente, le patologie derivanti da questi difetti genetici che coinvolgono le proteine lisosomiali vengono identificate sotto il nome di "malattie da accumulo lisosomiale" (LSD).^{6,7}

1.2.2 EPIDEMIOLOGIA

Le malattie da accumulo lisosomiale comprendono oltre 50 diverse condizioni genetiche in cui difetti nelle idrolasi, nei cofattori enzimatici e nelle proteine di membrana causano l'accumulo di varie sostanze all'interno dei lisosomi, tra cui glicogeno, sfingolipidi, colesterolo, glicoproteine o mucopolisaccaridi.

L'accumulo di tali sostanze a livelli tossici porta innanzitutto a disfunzioni a livello cellulare cui seguiranno lesioni multiorgano e un insieme eterogeneo di segni e sintomi che possono determinare disabilità fisiche e neurologiche.

La presenza di una vasta eterogeneità nella presentazione clinica delle malattie da accumulo lisosomiale costituisce un problema significativo nel raccogliere dati epidemiologici. Ciò, infatti, porta a diagnosi mancate e confusione nell'attribuzione della corretta patologia, causando una scarsa raccolta di dati epidemiologici e una sottovalutazione dell'impatto delle LSD nella comunità.⁸

Sebbene queste patologie siano rare individualmente, nel loro complesso si stima che abbiano una frequenza compresa tra 1 su 7000 e 1 su 8000 nati vivi.

La maggioranza delle patologie si trasmette per via autosomica recessiva, con alcune eccezioni date dalla malattia di Fabry e dalla mucopolisaccaridosi tipo II legate invece a trasmissione recessiva sul cromosoma X.

La possibilità di un'indagine epidemiologica adeguata è data dall'esistenza dei Registri delle Malattie Rare (RDR), essi costituiscono il più grande database osservazionale riguardante queste patologie. Grazie all'esistenza di questi registri è stato possibile negli ultimi anni una miglior comprensione di queste rare patologie ed inoltre, essi, hanno contribuito allo sviluppo di linee guida per la diagnosi, il monitoraggio ed il trattamento, stabilendo così uno standard di cura con l'obiettivo di migliorare la qualità di vita delle persone affette⁹

Un rapporto dall'Italia sugli errori congeniti del metabolismo ha riportato un'incidenza combinata delle LSD di 1 su 8275, con la malattia di Gaucher a 1 su 40 247 (21% di tutte le LSD segnalate)⁸

1.2.3 CLASSIFICAZIONE

Il numero delle patologie che si possono raggruppare sotto il nome di “malattie da accumulo lisosomiale” è sempre più numeroso. Esse possono essere però suddivise in categorie in funzione del metabolita accumulato, con la conseguente creazione di sottogruppi come le glicogenosi, le sfingolipidosi, le mucopolipidosi e le mucopolisaccaridosi.⁷

Le principali malattie da accumulo lisosomiale sono indicate in tabella 1.⁷

Nella pratica clinica queste patologie possono mostrare delle somiglianze nella loro presentazione o nel loro decorso, non rispettando quindi la rigida suddivisione. Per esempio, oltre il 66% delle LSD influisce sul sistema nervoso centrale. Questo porta ad una progressiva e debilitante diminuzione delle capacità motorie e, a volte, anche delle capacità cognitive. Altre caratteristiche comuni di molte LSD includono anomalie ossee, organomegalie ed un'aspettativa di vita accorciata.

Le correlazioni tra genotipo e fenotipo non sono però sempre ben definite. Una LSD causata da un singolo tipo di carenza enzimatica, e quindi appartenente allo stesso sottogruppo, può in realtà presentare una vasta gamma di sintomi, decorso della malattia e gravità. Tali manifestazioni cliniche variabili possono essere il risultato di mutazioni diverse all'interno dello stesso gene, del grado di inattivazione cromosomica, da cui deriva il livello di attività enzimatica residua, di fattori di modifica intracellulari (in gran parte sconosciuti) e/o di fattori ambientali. Al contrario, una singola LSD clinicamente definita, può essere il risultato di più di una carenza enzimatica, come nel caso della malattia di Sanfilippo (mucopolisaccaridosi tipo III). È fondamentale comprendere che l'interesse di una patologia per un determinato organo sia principalmente correlato a due fattori principali: il tessuto in cui si accumula principalmente il materiale da degradare e la sede fisiologica in cui avviene principalmente tale degradazione. La diagnosi e l'individuazione delle malattie da accumulo lisosomiale rappresentano quindi una sfida a causa della loro rarità e della vasta gamma di manifestazioni cliniche. Numerosi casi rimangono non diagnosticati, mentre altri vengono ignorati fino a quando la malattia non progredisce a uno stadio in cui si verificano danni irreversibili agli organi o ai muscoli, compromettendo l'efficacia del trattamento. È di fondamentale importanza individuare precocemente tali casi e condurre test sui membri della famiglia, poiché in molte di queste patologie, l'inizio tempestivo della terapia può influenzare significativamente gli esiti clinici dei pazienti.¹⁰

| Malattia | Carenza d'enzima | Significativo accumulo di metaboliti |
|--|---|---|
| Glicogenosi Malattia di Pompe | Alfa-1,4 glucosidasi | Glicogeno |
| Sfingolipidosi GM1 gangliosidosi Tipo 1 Tipo 2 GM2 gangliosidosi Malattia di Tay-Sachs Malattia di Sandhoff Variante AB | GM1 ganglioside beta-galattosidasi Esosaminidasi, subunità alfa Esosaminidasi subunità beta Proteina di attivazione del ganglioside | GM1 ganglioside, oligosaccaridi contenenti galattosio GM2 ganglioside GM2ganglioside, globoside GM2 ganglioside |
| Solfatidosi Leucodistrofia metacromica Carenza plurima di solfatasi Malattia di Krabbe Malattia di Fabry Malattia di Gaucher Malattia di Niemann-Pick | Ariolsolfatasi A Arisolfatasi A,B,C; solfatasi steroidea, iduronato solfatasi, eparan N-solfatasi Galattosilceramidasi Alfa-galattosidasi A Glucocerebrosidasi Sfingomielinasi | Solfatide Solfatide, steroidesolfato, eparan-solfato, dermatan-solfato Galattocerebroside Ceramide triesoside Glucocerebroside sfingomieline |
| Mucopolisaccaridosi MPS I Hurler MPS II Hunter | Alfa-L-iduronidasi L-iduronosolfato solfatasi | Dermatan-solfato, eparan-solfato |
| Mucolipidosi Malattia della I-cellula Polidistrofia pseudo Hurler | Carenza di enzimi della fosforilazione essenziali per la formazione del marcatore d'identificazione del mannosio-6-fosfato | Mucopolisaccaride glicolipide |

Tabella 1: Malattie da accumulo lisosomiale⁷

1.3 LE GLICOGENOSI

1.3.1 EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAZIONE

Le glicogenosi sono una serie di disturbi eterogenei legati a deficit ereditari di uno dei vari enzimi coinvolti nel metabolismo del glicogeno, dalla sua sintesi alla sua degradazione

Una parte del glicogeno viene degradata anche nei lisosomi dalla maltasi acida, una idrolasi che catalizza la rottura del legame alfa1-4. Si comprende così che il difetto di quest'enzima porta all'accumulo del substrato nei lisosomi determinando così l'insorgenza della malattia di Pompe, o glicogenosi di tipo II, l'unico esempio di glicogenosi a far parte della famiglia di malattie da accumulo lisosomiale.^{11,12}

Finora sono state identificate circa dodici glicogenosi ma l'elenco è in aumento, classificate con numeri romani in base all'enzima deficitario e agli organi e tessuti interessati (tabella 2)¹². Queste patologie possono manifestarsi in qualsiasi fase della vita, dall'infanzia all'età adulta, con un'incidenza stimata di circa 1 caso ogni 20.000-43.000 nati vivi. I sottotipi più comuni sembrano essere il tipo I e III.¹³ Come evidenziato parlando di metabolismo del glicogeno, la maggior parte di esso è presente nel fegato e nel muscolo striato, dove infatti si manifestano principalmente i sintomi di queste patologie. Esse possono infatti essere anche suddivise in tre principali sottogruppi, in base all'organo maggiormente coinvolto:

1. "Forme epatiche": il deficit enzimatico nel fegato porta non solo all'accumulo di glicogeno, ma anche a ipoglicemia, poiché il fegato è coinvolto nella sintesi, stoccaggio e rilascio di glucosio nel sangue. Un esempio è la glicogenosi di tipo I o malattia di Von Gierke, causata da un deficit di glucosio-6-fosfatasi.

2. "Forme miopatiche": qui il glicogeno è utilizzato principalmente per la produzione di ATP, ed un suo accumulo causa quindi debolezza muscolare, crampi, dolori ed intolleranza all'esercizio fisico. Un esempio è la glicogenosi di tipo V o malattia di McArdle, causata da un deficit di fosforilasi muscolare.

3. "Forme eterogenee": includono il deficit di maltasi acida e dell'enzima debranchificante.⁷ Queste patologie a differenza dei primi sottogruppi portano ad un accumulo sistemico di

glicogeno, coinvolgendo più organi. Il deficit di maltasi acida provoca come già precedentemente detto l'accumulo di glicogeno nei lisosomi, determinando la glicogenosi di tipo II o malattia di Pompe. Questa patologia può manifestarsi con segni e sintomi multiorgano, con particolare rilevanza per la cardiomegalia presente nelle forme infantili.

Non da sottovalutare è anche il coinvolgimento cerebrale di tutte queste patologie, legato principalmente allo stato di ipoglicemia e particolarmente dannoso durante il periodo neonatale. Va infatti ad interferire con il processo di sinaptogenesi fondamentale in questa fase.¹⁴

| Nome | enzima interessato | organo interessato principale | Sintomi |
|-------------|--|--|--|
| Tipo 0 | Glicogeno sintasi | Fegato | Ipoglicemia, chetonemia, morte in giovane età |
| Tipo Ia | Glucosio-6-fosfatasi | Fegato | Epatomegalia, IR |
| Tipo Ib | Glucosio-6-fosfatasi traslocasi microsomiale | Fegato | Epatomegalia, IR Suscettibilità alle infezioni |
| Tipo Ic | Trasportatore di P microsomiale | Fegato | Epatomegalia, IR |
| Tipo II | Glucosidasi lisosomiale | Muscolo scheletrico e cardiaco | Forma infantile: morte entro 2 anni, forma giovanile: miopatia, forma adulta: sintomi uguali a distrofie muscolari |
| Tipo IIIa | Enzima deramificante | fegato, muscolo scheletrico e cardiaco | Epatomegalia infantile, miopatia |
| Tipo IIIb | Enzima deramificante del fegato | Fegato | Epatomegalia infantile |
| Tipo IV | Enzima ramificante | Fegato, muscolo scheletrico | Epatosplenomegalia, mioglobinuria |
| Tipo V | Fosforilasi muscolare | Muscolo scheletrico | crampi e dolori indotti dall'attività fisica, mioglobinuria |
| Tipo VI | Fosforilasi epatica | Fegato | Epatomegalia |
| Tipo VI | PFK-1 del muscolo | Muscolo, eritrociti | Come tipo V più anemia emolitica |
| Tipo VIII | Fosforilasi chinasi | Fegato, leucociti, muscolo | Epatomegalia |
| Tipo XI | GLUT2 | Fegato | Epatomegalia, crescita ridotta, rachitismo, disfunzione renale |

Tabella 2: Disfunzioni da accumulo di glicogeno nell'uomo¹²

1.4 LA MALATTIA DI POMPE

1.4.1 DEFINIZIONE

La malattia di Pompe, conosciuta anche come glicogenosi di tipo II, è un raro disturbo neuromuscolare trasmesso attraverso un'eredità autosomica recessiva, che può manifestarsi in individui di tutte le età con vari quadri clinici. Fu per la prima volta descritta dal patologo olandese Joannes Cassianus Pompe nel 1932 durante l'autopsia di una paziente di 7 mesi con diagnosi di "cardiopatía ipertrofica idiopática". Il medico descrisse il quadro riscontrato come "massivo accumulo vacuolare di glicogeno in praticamente tutti i tessuti"¹⁵. Divenne così la prima entità riconosciuta e descritta all'interno di ciò che ora è noto come un vasto serbatoio di malattie da accumulo lisosomiale.¹⁵

1.4.2 FISIOPATOLOGIA

La malattia di Pompe è causata da mutazioni nel gene responsabile della produzione dell'enzima alfa-glucosidasi (GAA) o maltasi acida, coinvolto nella degradazione delle molecole di glicogeno all'interno dei lisosomi. La carenza di questo enzima porta all'accumulo del substrato non degradato, provocando un accumulo lisosomiale di glicogeno in molti tessuti dell'organismo, ma interessando soprattutto il tessuto muscolare scheletrico e cardiaco.¹⁵

La malattia di Pompe non si presenta come un'unica entità, ma piuttosto con una varietà di spettri patologici che differiscono per età di insorgenza, organi colpiti e sintomatologia.

La diversità nella presentazione clinica della malattia è correlata al livello residuo di attività della maltasi acida. Ciò che sottende a queste diverse presentazioni è la varietà di mutazioni diverse che interessano il cromosoma 17 dove risiede il gene GAA. Sono state individuate

centinaia di mutazioni diverse e, solitamente, questa diversità riflette anche diversità etniche, come nel caso della mutazione IVS1, riscontrata soprattutto nei caucasici.

La presentazione clinica della malattia può essere quindi suddivisa principalmente in due grandi gruppi: la forma neonatale (IOPD), caratterizzata da un'assenza o quasi di attività enzimatica e dunque una maggiore gravità della patologia, e la forma adulta (LOPD), dove l'attività enzimatica è deficitaria ma non nulla, manifestando una varietà di gradi di inattività, quindi una presentazione clinica più sfumata, generalmente insorgendo in età più avanzata, arrivando a presentarsi anche in età adolescenziale o adulta.¹⁶

1.4.3 EPIDEMIOLOGIA E SCREENING

La prevalenza stimata della malattia di solito viene riportata come 1 caso su 40.000 nati vivi, ma l'introduzione recente dello screening neonatale (NBS) per la malattia di Pompe ha rivelato una frequenza notevolmente superiore.¹⁷ I sistemi di screening attuali vanno a misurare l'attività della alfa-glucosidasi su campione di sangue ottenuto dalla puntura del tallone del neonato, successivamente essiccato su carta filtro (DBS), su linfociti o fibroblasti tramite la spettrometria di massa tandem (MS/MS). La diagnosi definitiva però può essere formulata solo dopo analisi genetica.¹⁸ Un esempio di iter di screening è riportato in Figura 1.¹⁹

Il primo programma di questo tipo è stato avviato a Taiwan nel 2005, area dove la prevalenza della malattia nella sua forma neonatale, ovvero la più pericolosa, è particolarmente elevata a causa di un effetto fondatore.

Su 473'738 neonati sottoposti a screening furono rilevati 28 casi positivi con un'incidenza di 1 su 16'919. Sorprendentemente anche in altri paesi, dove non era noto nessun effetto fondatore, l'incidenza della patologia si è rilevata essere molto più elevata del previsto. Citiamo i casi dell'Austria con un'incidenza di 1 caso su 8684 nati vivi oppure ancora dello stato del Missouri che rilevò un'incidenza di 1 su 5463 nati vivi. Questi dati rappresentano

però le incidenze della malattia di Pompe in tutte le sue forme, sottolineiamo quindi il fatto che la LOPD è più frequente rispetto alla IOPD. Dato l'ottimo miglioramento in termini di sopravvivenza, dovuta all'inizio tempestivo della terapia enzimatica sostitutiva in seguito allo screening, nel 2013 gli Stati Uniti hanno incluso la malattia di Pompe nel "Pannello di Screening Uniforme Raccomandato" del Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani.²⁰

In Italia uno studio recente effettuato da Gragnaniello et al. ha reclutato per lo screening 206'741 pazienti calcolando un'incidenza di 1 su 18'795 (1 su 68'914 per la forma infantile e 1 su 25'843 per la forma tardiva). Lo studio sottolinea inoltre come le differenze di stima ritrovate nelle indagini svolte negli altri stati sono possibilmente da ricondurre al background etnico predominante, differenze nei test di screening e valori soglia scelti, oltre alla presenza di pseudodeficienze e alla rarità stessa della malattia.¹⁸

1.4.4 CLASSIFICAZIONE

La malattia di Pompe può essere classificata in due principali spettri clinici sulla base dell'età di esordio dei sintomi. Distingueremo quindi una manifestazione infantile (IOPD) con sintomi prevalentemente cardiaci e muscolari ed una prognosi più grave, ed una forma ad esordio tardivo (LOPD) con sintomi più sfumati, talvolta molto simili ad una distrofia muscolare, ed una prognosi solitamente migliore. Lo spettro clinico presenta inoltre forme intermedie tra i due estremi di malattia.

Sulla base della classificazione proposta dall' American College of Medical Genetics la forma infantile può essere ulteriormente distinta in classica (CIOPD) ed una non-classica (NCIOPD) sulla base della presentazione clinica e dell'età di esordio che, per la forma non-classica, è solitamente dopo l'anno.²¹

Grazie alle nuove tecniche diagnostiche è stato anche possibile identificare una forma intrauterina di malattia, la letteratura si esprime poco però su questo argomento data la difficoltà di una diagnosi prenatale dovuta alla mancanza di specifiche manifestazioni.²²

1.4.5 CLINICA INFANTILE ONSET POMPE DISEASE

La forma classica infantile di malattia di Pompe ha esordio nel primo anno di vita, solitamente intorno ai due mesi, con sintomi quali: difficoltà nella nutrizione ed un conseguente ritardo di crescita nel 44-97% dei casi, ipertrofia cardiaca nel 50-92%, e difficoltà respiratorie nel 27-78%. L'aspettativa di vita in questi neonati, soprattutto se non diagnosticati molto precocemente, non supera i 9 mesi di vita. La forma infantile non-classica invece si presenta solitamente intorno ai 30 mesi di vita e con sintomi quali ritardo nello sviluppo motorio e debolezza muscolare generalizzata.

Come si è potuto evidenziare la forma non-classica di malattia presenta solitamente sintomi più lievi ed una prognosi migliore rispetto alla forma classica. Questo si rispecchia nelle manifestazioni di malattia, presenti in entrambe le forme ma in percentuali diverse di casi.^{21,23} Ad esempio, il coinvolgimento del miocardio è stato osservato solo nel 10% dei casi di forma non classica. Nella forma classica, invece, questo è molto frequente e solitamente l'ipertrofia va soprattutto ad interessare il ventricolo sinistro nella sua porzione posteriore e il setto interventricolare conducendo, rapidamente, a scompenso cardiaco.²⁴

L'ingrossamento progressivo del cuore e le alterazioni del ritmo cardiaco possono portare a complicazioni gravi, talvolta mortali, nei pazienti non trattati. I segni elettrocardiografici possono includere un intervallo PR corto, la sindrome di Wolff-Parkinson-White, che riflette una conduttività atrioventricolare accelerata a causa dell'accumulo di glicogeno nel fascio di His, e/o tachicardia sopraventricolare.²⁵

Prima dell'introduzione della terapia sostitutiva enzimatica (ERT), l'insufficienza cardiaca era la principale causa di morte nei pazienti con la forma infantile classica della malattia di Pompe. Dall'introduzione della terapia sostitutiva enzimatica con alfa-glucosidasi umana ricombinante (rhGAA, alglucosidasi alfa), la sopravvivenza è migliorata significativamente, principalmente grazie alla riduzione dell'ipertrofia e al miglioramento della funzione cardiaca.²⁶

Per quanto riguarda i sintomi respiratori spesso nella forma classica l'insufficienza respiratoria è la causa del decesso dovuta alla debolezza progressiva dei muscoli respiratori e della presenza di importante cardiomegalia che può condurre ad importanti atelettasie. La debolezza dei muscoli e l'inefficienza del meccanismo della tosse, presente nei neonati fisiologicamente, predispongono inoltre all'insorgenza di polmonite batterica. Nella forma

non classica l'esordio dei sintomi respiratori è invece tardivo e i pazienti possono necessitare di assistenza respiratoria verso i 9 anni di età.²⁷

Nei neonati affetti, inoltre, la scarsa tonicità facciale, la lingua ingrossata e la debolezza nei movimenti della bocca rendono difficile l'atto di suzione, compromettendo così la crescita e l'incremento di peso. La debolezza muscolare può causare problemi di deglutizione, reflusso gastroesofageo, rallentamento dello svuotamento gastrico e stitichezza. In alcuni casi, potrebbero manifestarsi anche ingrossamento del fegato e/o della milza.

Infine, si possono ritrovare anche sintomi neurologici: questi si presentano nei neonati affetti da CIOPD tra 0 e 4 mesi di età e includono una scarsa tonicità muscolare fin dalla nascita, una diminuzione dei riflessi o l'assenza di essi e una debolezza muscolare nel viso (con caratteristiche facciali distinte), nel tronco e negli arti. I muscoli vicini alle articolazioni degli arti inferiori sono i più colpiti. Si sviluppano schemi di movimento compensativi a causa della debolezza diffusa e della limitata mobilità, che possono portare a deformità e retrazioni articolari. La debolezza muscolare nella zona orolinguale e nel diaframma influisce precocemente sulla capacità di deglutire e sulla funzione respiratoria, causando inoltre ritardi nell'acquisizione del linguaggio espressivo.^{28,29}

Nel caso della NCIOPD, i muscoli flessori del collo risultano i più compromessi, rendendo difficile sollevare la testa mentre si è distesi. La debolezza muscolare nei segmenti vicini al tronco provoca frequenti cadute e difficoltà nel salire le scale, correre e praticare sport. Circa la metà dei bambini presenta un aspetto facciale caratteristico, scoliosi e mancanza di riflessi. Non sono state riscontrate né difficoltà di deglutizione né problemi nel linguaggio.²¹

1.4.6 DIAGNOSI

La diagnosi di malattia di Pompe può essere formulata definitivamente solo tramite analisi enzimatiche e test genetici. L'anamnesi, l'esame obiettivo, i livelli degli enzimi muscolari circolanti e l'elettromiografia (EMG) vanno a costituire le prime indagini cliniche e sono utilizzati per determinare quali pazienti dovrebbero essere sottoposti a ulteriori test specifici per la malattia di Pompe. A questi ultimi si aggiungono l'esecuzione di una radiografia del torace e di un ECG, fondamentali per il riscontro di segni di cardiomiopatia ipertrofica.

Si prevede che l'analisi di laboratorio mostri livelli elevati di creatin-chinasi (CK) nella maggioranza dei pazienti, anche se talvolta possono risultare nella norma. Di solito, i livelli di CK non superano le 2000 U/L, con una media di circa 600-700 U/L. L'elettromiografia mostra classicamente una miopatia irritabile che coinvolge i muscoli prossimali. Uno dei tratti distintivi osservati nella malattia di Pompe all'elettromiografia sono le scariche miotoniche nei muscoli paravertebrali. Inoltre, i risultati della risonanza magnetica muscolare (MRI), che si può possibilmente aggiungere agli esami strumentali richiesti per la diagnosi, in soggetti affetti da malattia di Pompe, indicano un interessamento dei muscoli estensori della colonna vertebrale e della cintura pelvica, offrendo dettagli sulle modifiche muscolari, soprattutto nella lingua e nel muscolo sottoscapolare. Questa tecnica potrebbe anche fungere da indicatore nel monitoraggio dei pazienti nel tempo. È emerso che l'MRI a tutto il corpo potrebbe essere preziosa per valutare il coinvolgimento muscolare nella malattia di Pompe, soprattutto al momento della diagnosi, e nel documentare la progressione della patologia in individui sottoposti a terapia sostitutiva enzimatica.³⁰

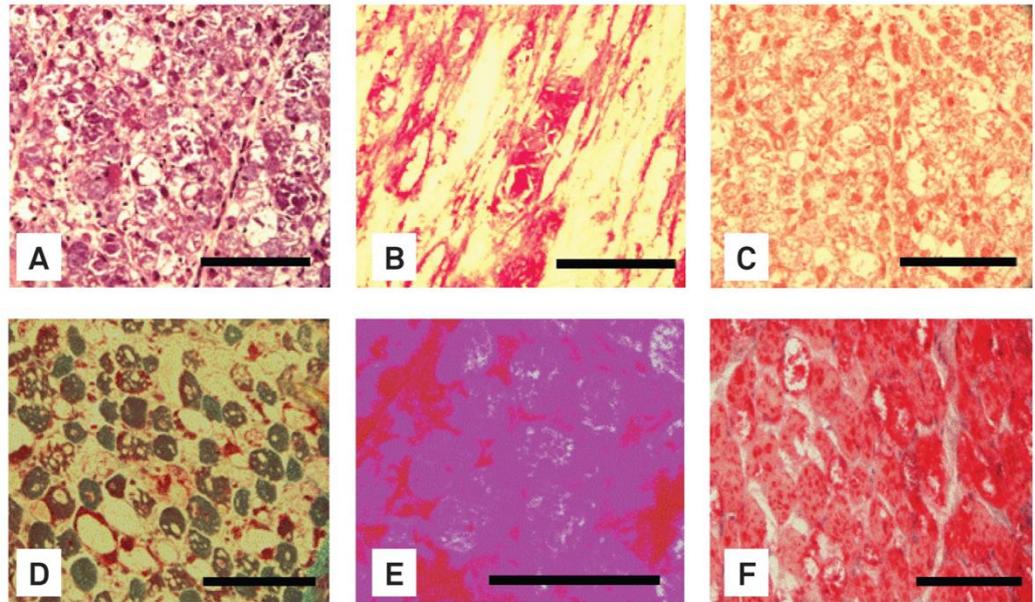
Per una diagnosi definitiva e specifica si effettuano test di secondo livello più invasivi ma determinanti: la biopsia muscolare, gli esami enzimatici e i test genetici. La biopsia muscolare del classico IOPD rivela una prominente miopatia vacuolare con variazione delle dimensioni delle fibre. Molte fibre muscolari contengono vacuoli rotondi di dimensioni variabili sub-sarcolemmali o citoplasmatici. Questi vacuoli sono trasparenti o contengono materiali grigi sottili, mentre alcuni sono riempiti da detriti metacromatici, prodotti finali dell'autofagia. La colorazione PAS mostra un eccesso di glicogeno prominente in quasi tutte le fibre muscolari, anche se il contenuto di glicogeno di alcuni vacuoli si perde durante il trattamento del campione muscolare. La colorazione con PAS-D rivela la digestione di tutto il contenuto di glicogeno.³¹ Risulterà inoltre fondamentale l'analisi ultrastrutturale dei campioni al TEM, al fine di individuare abbondanti accumuli di granuli in glicogenosomi.

In Figura 1 e Figura 2 vengono riportate alcune biopsie muscolari analizzate al MO con diversi metodi di colorazione.³²

Gli esami enzimatici sono in grado di rilevare una carenza di alfa-glucosidasi acida, tipica di questa condizione. In particolare, questi test vanno a misurare il grado di attività residuo dell'enzima, la stessa metodica che viene utilizzata nello screening neonatale. Questi test possono essere eseguiti su tessuto muscolare biopsiato o campioni di sangue, leucociti o fibroblasti. In particolare, il metodo più utilizzato è quello su un campione di sangue essiccato (DBS). Alcuni considerano la conferma della carenza enzimatica su due tipi di campione diversi come un elemento diagnostico, anche in assenza di biopsia muscolare o test genetici.³³

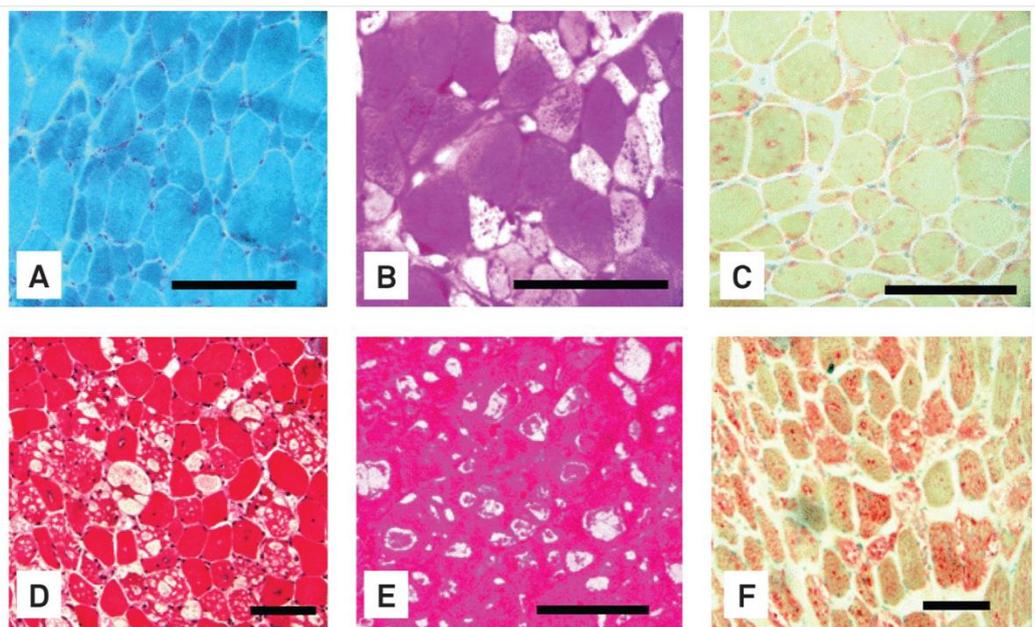
Infine, il sequenziamento del gene GAA rappresenta il passaggio diagnostico definitivo. Il gene GAA si trova nel tratto 17q25.2-25.3 del genoma umano. Più di 580 mutazioni diverse nel gene dell'alfa-glucosidasi acida causano la carenza di tale enzima, con conseguenti manifestazioni cliniche varie, alcune delle quali portano a una malattia che progredisce rapidamente. La forma più frequente è rappresentata da mutazioni missenso, ritrovate in circa la metà dei pazienti. L'analisi del gene GAA è raccomandata come test confermativo nell'algoritmo diagnostico della malattia di Pompe. Le metodologie per identificare le mutazioni includono pannelli mirati, analisi completa della sequenza, sequenziamento dell'intero esoma e analisi di delezioni/duplicazioni.³⁴

Un importante sfida, in ambito diagnostico, è rappresentata dal fatto che gli esami enzimatici utilizzati negli screening neonatali non riescono a distinguere in modo affidabile tra IOPD e LOPD. Sono dunque fondamentali test di conferma con sequenziamento genetico, i quali, aiutano a determinare se un risultato positivo al campione di sangue indica una IOPD, la quale richiede un trattamento tempestivo, o una LOPD che potrebbe manifestarsi solo anni o decenni dopo. Se però il quadro clinico corrisponde a IOPD e lo screening mostra una carenza enzimatica, spesso il trattamento inizia prima della conferma genetica, che può richiedere settimane per ottenere i risultati.³⁵



(A) Hematoxylin-eosin; (B and E) Periodic acid-schiff; (C and F) Acid phosphatase; (D) Modified Gomori trichrome. Bar 100 micra.

Figura 1: Malattia di Pompe (forma infantile). La maggior parte delle fibre del sarcoplasma è sostituita da vacuoli riempiti di glicogeno e con un'attività elevata di fosfatasi acida. (A a C) due mesi di età (D a F) dieci mesi di età.³²



(A) Modified Gomori trichrome; (B and E) Periodic acid-schiff; (C and F) Acid phosphatase; (D) Hematoxylin-eosin. Bar 100 micra.

Figura 2: Malattia di Pompe (forma infantile). Variazioni nel diametro delle fibre, fibre con e senza vacuoli (piccoli e grandi), vacuoli riempiti di glicogeno, aumento dell'attività della fosfatasi acida (focale o nei vacuoli). (A a C) 7 anni di età (D a F) 11 anni di età.³²

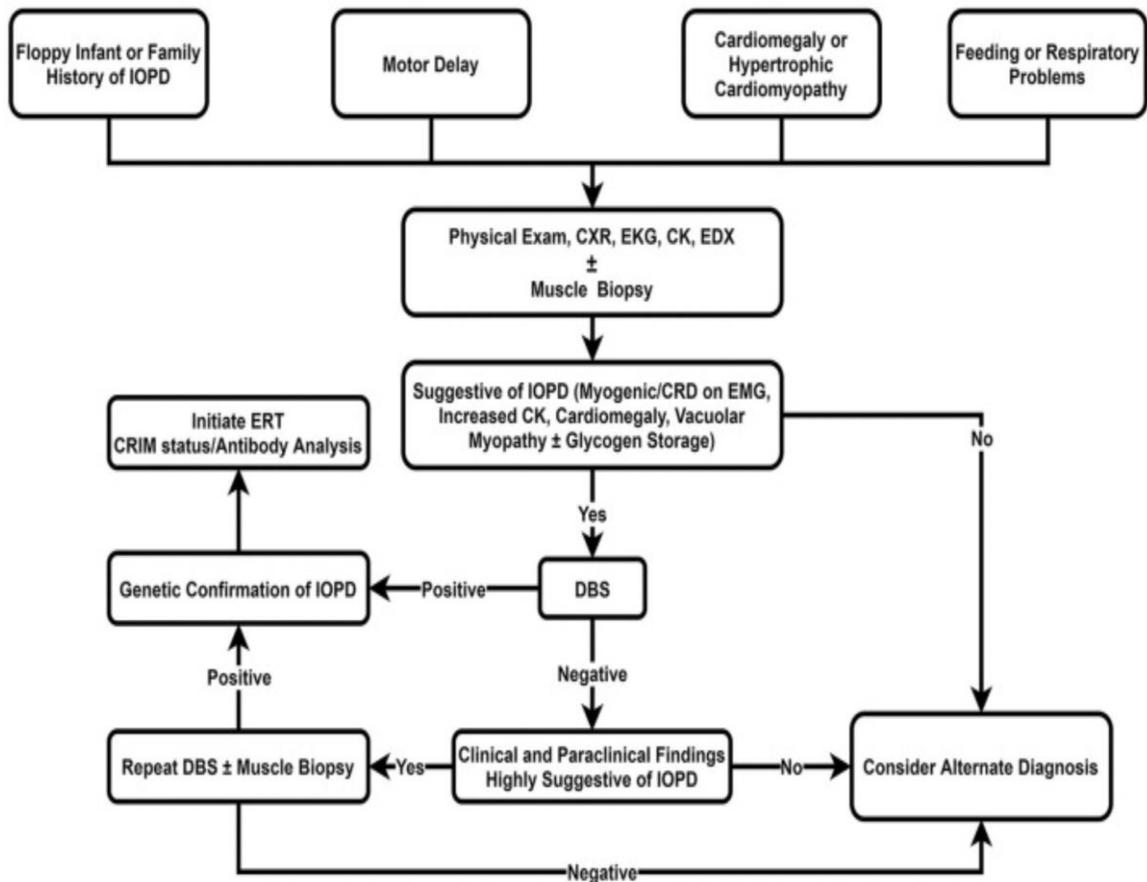


Figura 3: Approccio diagnostico per IOPD: CK, creatinchinasi; CRD, scarica complessa ripetitiva; CXR, radiografia del torace; DBS, campione di sangue essiccato; EDX, elettrodiagnosi; EKG, elettrocardiogramma; EMG, elettromiografia; ERT, terapia sostitutiva enzimatica; IOPD, malattia di Pompe con esordio infantile; LOPD, malattia di Pompe con esordio tardivo.³¹

1.6.1 DIAGNOSI DIFFERENZIALE

La diagnosi della malattia di Pompe spesso presenta un dilemma diagnostico a causa della rarità della condizione e della natura relativamente non specifica delle caratteristiche fenotipiche che, possono solo in modo aggregato portare al sospetto di malattia.

Secondo le linee guida redatte da Kishnani et al. Le patologie da prendere in considerazione come diagnosi differenziale di malattia di Pompe sono riassunte in tabella 5 e 6.³⁶

| Differential diagnosis | Shared signs and symptoms |
|--|--|
| Acute Werdnig-Hoffman disease (Spinal Muscular Atrophy I) | Hypotonia, progressive proximal myopathy, absent reflexes |
| Hypothyroidism | Hypotonia, macroglossia |
| Endocardial fibroelastosis | Breathlessness, feeding difficulties, cardiomegaly, heart failure |
| Myocarditis | Cardiomegaly |
| Congenital muscular dystrophy | Severe hypotonia and muscle weakness |
| Glycogen storage diseases: IIIa (Debrancher deficiency/Cori or Forbes disease and, IV (Branching enzyme deficiency/Anderson disease) | Cardiomegaly, myopathy, elevated creatine kinase (CK) |
| Mitochondrial/respiratory chain disorders | Hepatomegaly, muscle weakness, cardiomegaly, elevated creatine kinase (CK) |
| Danon disease | Cardiomegaly, cardiomyopathy, myopathy, vacuolar glycogen storage |
| Idiopathic hypertrophic cardiomyopathy | Biventricular hypertrophy |
| Peroxisomal disorders | Hypotonia, hepatomegaly |

Tabella 3: Diagnosi differenziale di IOPD secondo linee guida

La differente combinazione di segni e sintomi iniziali sarà la guida per il medico verso l'esecuzione dei corretti esami laboratoristici e strumentali, secondo l'approccio diagnostico evidenziato precedentemente, al fine di arrivare alla diagnosi finale.

1.4.7 TERAPIA

Il trattamento di riferimento attuale per la malattia di Pompe rimane l'ERT, che richiede la somministrazione endovenosa a vita di GAA umana ricombinante (rhGAA). La possibilità di poter somministrare questa terapia sostitutiva è nata dalla scoperta dell'esistenza di un recettore per il mannosio-6-fosfato anche sulla superficie cellulare, chiamato CI-M6PR. L'enzima ricombinante si lega a questo recettore, viene internalizzato nella cellula e può dunque esplicare la sua funzione all'interno dei lisosomi, grazie alla presenza, anche sui lisosomi, del recettore per il mannosio-6-fosfato.³⁷ Al momento, solo l'α-glucosidasi alfa (Myozyme® o Lumizyme®) è approvata come terapia con rhGAA per entrambe le forme di questa malattia (IOPD, LOPD). Tuttavia, il regime posologico di 20 mg/kg ogni due settimane è relativamente elevato rispetto ad altre terapie ERT per malattie di accumulo lisosomiale e non affronta completamente le sfide legate al trattamento a lungo termine della malattia. Infatti, sebbene questo regime posologico raggiunga un'efficace eliminazione del glicogeno nel cuore e la risoluzione della cardiomiopatia, è meno efficace nell'eliminazione del glicogeno nel muscolo scheletrico e non risolve il declino respiratorio o neurologico. Una delle principali sfide nell'uso esclusivo dell'ERT, per garantire una sopravvivenza senza sintomi a lungo termine, è quindi la sua limitata efficacia nel raggiungere i tessuti colpiti, dovuta a diversi fattori, tra cui la distribuzione ridotta di rhGAA nei tessuti, la bassa disponibilità di CI-M6PR sulle cellule muscolari scheletriche e l'assunzione preferenziale di rhGAA nel fegato.

Per migliorare l'assorbimento cellulare e la biodisponibilità di rhGAA, sono state sviluppate diverse tecniche, le quali portano ad una modificazione dell'enzima. Queste includono l'aggiunta di porzioni di oligosaccaride fosforilate³⁸, tecnologia utilizzata dalla seconda generazione di ERT con il farmaco α-glucosidase alfa (Nexviazyme®) recentemente approvato per la malattia di Pompe tardiva, con studi clinici in corso per la malattia infantile³⁹

Studi recenti hanno dimostrato che i pharmacological chaperone, utilizzati inizialmente per favorire il ripiegamento corretto degli enzimi mutati, possono anche aumentare la stabilità degli enzimi endogeni wild-type. Inoltre, studi preclinici hanno dimostrato che i PC migliorano anche la stabilità dell'enzima, il traffico lisosomiale e/o l'attività in cellule di Pompe, Fabry e Gaucher coltivate con gli enzimi ricombinanti esogeni.⁴⁰ Questa osservazione ha dato origine a una nuova applicazione dei PC nota come terapia combinata.

Questa consiste non nell'aumentare l'attività residua di un enzima mutante, ma nell'aumentare l'efficienza degli enzimi ricombinanti utilizzati per l'ERT, combinando quest'ultima e la terapia con PC. Pertanto, questa strategia terapeutica non è più limitata ad alcune varianti dell'enzima, ma è estesa al trattamento combinato nei pazienti trattati con ERT.³⁷

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

La cardiomiopatia ipertrofica in età pediatrica è un quadro raro, ma potenzialmente mortale. Sono diversi gli agenti eziologici che possono portare allo sviluppo di questa patologia: mutazioni geniche a livello delle proteine costituenti il sarcomero, disturbi ereditari del metabolismo, sindromi genetiche ereditarie, infezioni. Si comprende quindi che il corretto inquadramento diagnostico è possibile soltanto approfondendo la storia del malato, attraverso esami specifici, fino alla conferma genetica, indispensabile in alcuni casi, per porre una diagnosi definitiva.

Questo studio, attraverso un'analisi della storia clinica e delle indagini laboratoristiche e strumentali eseguite prima e dopo il decesso della paziente causato da grave insufficienza respiratoria in un quadro di ipertrofia cardiaca, mira a valutare e considerare quanto l'inquadramento diagnostico di una cardiomiopatia ipertrofica neonatale possa essere notevolmente complicato, in quanto, il quadro di diagnosi differenziali è molto ampio. Obiettivo dello studio è anche quello di evidenziare la concordanza tra il quadro clinico del caso presentato e quanto vi è presente in letteratura riguardo alla malattia di Pompe, principale indiziata, inizialmente, come corretta diagnosi. Attraverso questo si potrà dunque arrivare alla conclusione che, nonostante le indagini siano fortemente suggestive per una condizione, solo la definitiva diagnosi genetica può essere dirimente.

3. PAZIENTE E METODI

Lo studio include una paziente che, nel novembre del 2023, ha ricevuto sospetto di diagnosi di glicogenosi di tipo 2 o malattia di Pompe, post mortem, presso l'Anatomia Patologica dell'AOU Maggiore della Carità di Novara. La paziente, prima del decesso, è stata ricoverata sette giorni presso la Clinica Pediatrica del medesimo presidio ospedaliero. Le informazioni cliniche, inerenti al ricovero nel reparto di Clinica Pediatrica, sono state ricavate dalla cartella clinica della paziente.

3.1 STORIA CLINICA

Il caso qui descritto si riferisce ad una paziente lattante di circa 4 mesi, la quale, si presenta trasportata da domicilio dai genitori presso il Pronto Soccorso Pediatrico del S.C.D.U di Clinica Pediatrica di Novara, il 3 novembre 2023. La madre riferisce che la bambina presenta tosse dal 1° novembre e dal giorno successivo dispnea e difficoltà nell'alimentazione. Fa anche riferimento alla presenza di febbre della durata di 4 giorni in seguito alla somministrazione della prima dose di vaccino anti-meningococco B avvenuta in data 27/10 come da calendario vaccinale. All'arrivo in Pronto Soccorso la paziente è in buone condizioni generali e presenta parametri vitali adeguati all'età (SpO2 100%, FR 60 atti/min, FC 140 bpm). All'esame obiettivo si riscontrano segni di distress respiratorio quali rientramenti sottocostali e al giugulo ed alitamento delle pinne nasali. All'auscultazione del torace il murmure vescicolare è aspro e apprezzabile su tutto l'ambito, si odono inoltre rantoli crepitanti alle basi bilateralmente. Nel sospetto di una bronchiolite da virus respiratorio sinciziale (RSV) la paziente esegue in regime di urgenza un test rapido per la ricerca di RSV, con successivo risultato negativo.

La lattante esegue inoltre un EGA capillare i cui risultati sono riportati a seguito.

| | | |
|----------|-----------------------|--------------|
| PH | 7.27 | VN 7.35-7.45 |
| pCO2 | 40.6 mmHg. | VN 35-45 |
| pO2 | 42.2 mmHg | VN 80-100 |
| Na | 132 mmol/L | VN 135-145 |
| K | 13.2 mmol/L (emolisi) | |
| Ca | 4.94 mg/dL | VN 8.4-10.6 |
| Hb | 11.5 g/dL | VN 9.5-14 |
| Glicemia | 74 mg/dL | VN 70-100 |
| Lattato | 4.7 mmol/L | VN 0.5-2.2 |
| HCO3- | 18.9 mmol/L | VN 22-26 |
| sBE | -7.9 mmol/L | |

Si riscontra dunque un quadro di acidosi metabolica associata ad insufficienza respiratoria di primo tipo e rialzo del lattato.

Vengono inoltre svolti degli esami ematochimici che documentano un emocromo con formula di norma, una funzionalità epato-renale di norma e la presenza di lieve rialzo della PCR

| | |
|-----|----------------|
| Hb | 11,8 g/dL |
| Ht | 35.7% |
| PLT | 278'000/microL |
| GB | 13950/microL |
| N | 26.9% |
| L | 66.4% |
| M | 5.8% |
| E | 0.9% |
| B | 0.0% |

| | |
|------------|------------|
| Creatinina | 0.21 mg/dL |
| GOT | 38 U/I |
| GPT | 21 U/I |
| PCR | 2.69 mg/dL |

La paziente viene dunque posta in OBI dove le viene avviata un'infusione glucoelettrolitica e le vengono somministrati 0,5 mg di Betametasone per os.

Nel contesto di osservazione e monitoraggio, in seguito alla persistenza dei segni di distress respiratorio ed il riscontro al pulsiossimetro di una saturazione oscillante tra il 91% e il 93% in aria ambiente, si avvia inoltre ossigenoterapia 1L/min con cannule nasali. Viene dunque ripetuto un EGA capillare che attesta un lieve miglioramento dei valori (pH 7.34, pCO₂ 34.7 mmHg, pO₂ 51.7 mmHg, HCO₃⁻ 18.7 mmol/L, lattati 3.6 mmol/L)

La paziente viene dunque ricoverata presso il Reparto di Pediatria con la diagnosi di ammissione di bronchiolite RSV negativa in un quadro di distress respiratorio per la prosecuzione delle cure e approfondimenti diagnostici del caso clinico.

Approfondendo la storia anamnestica della bambina si riscontra la consanguineità dei genitori, entrambi di etnia egiziana, che risultano essere cugini di terzo grado. Il padre di 44 anni è in ABS, la madre di 29 anni invece soffre di ipotensione ed ha sofferto durante la gravidanza di diabete gestazionale, il quale, non è stato trattato. La coppia ha avuto altri 4 figli, 2 figli maschi in ABS di 11 e 10 anni, una figlia femmina in ABS di 6 anni ed un ulteriore figlia femmina deceduta a 3 mesi per una sospetta cardiopatia non ulteriormente indagata. La lattante risulta essere negativa agli screening neonatali.

All'anamnesi fisiologica la paziente risulta quindi essere la quinta figlia in ordine di genitura, nata da parto cesareo a termine, a seguito di una gravidanza complicata dalla presenza di diabete gestazionale, con un peso alla nascita di 2800 g. Si alimenta con latte misto, materno e formula, presenta solitamente un buon appetito ed ha un alvo regolare.

Al controllo della circonferenza cranica risulta uno sviluppo coincidente con l'età anagrafica del soggetto ed il peso attuale di 4800 g è coerente con una crescita normale.

All'esame obiettivo la paziente presenta cute e annessi secondo etnia, non presenta esantemi o segni di diatesi emorragica mucocutanea ed ha un tempo di refill capillare < di 2 secondi.

Si possono notare lieve iperemia della faringe ed i segni di distress respiratorio precedentemente descritti con, inoltre, evidenza di un respiro appoggiato. I toni cardiaci sono validi e ritmici, l'addome è trattabile in toto, meteorico e apparentemente non dolente alla palpazione. Fegato e milza sono nei limiti.

All'esame neurologico la paziente risulta vigile e reattiva con pianto valido e buona consolabilità. Non presenta segni meningei né segni neuropatologici acuti in atto.

In seguito al ricovero ed al miglioramento della saturazione (96%) la bambina proseguiva la terapia con:

- Aerosol con Salbutamolo e Ipratropio Bromuro 3 volte die
- Betametasone 0,5 mg/die per os
- Ossigeno-terapia 1 L/min in cannule nasali

Esegue inoltre ricerca per virus respiratori su tampone nasale.

Il giorno successivo, 4/11, in considerazione della fluttuazione della saturazione ed il quadro respiratorio in peggioramento, la terapia con ossigeno viene mantenuta a 1L/min e vengono proposti: lavaggi nasali con aspirazione e l'avvio di una terapia aerosolica con 2 mL di soluzione ipertonica 3% e due gocce di Ipratropio bromuro, con successiva stabilizzazione della sintomatologia respiratoria. Vengono ricontrollati gli indici di flogosi con PCR a 0.94 mg/dL e viene eseguito un EGA capillare che documenta una buona risposta alla terapia (pH 7.39, pCO₂ 37.5 mmHg, pO₂ 55.6 mmHg, HCO₃⁻ 22.7 mmol/L, elettroliti di norma). La paziente il giorno seguente rimane sostanzialmente stabile, permane la difficoltà di alimentazione al seno materno e la madre riferisce due episodi di vomito catarrale.

Il giorno 6/11 la bambina satura 99% in ossigeno-terapia 2L/min in cannule nasali, è tachipnoica e presenta una frequenza cardiaca di 120 bpm. All'esame obiettivo presenta respiro addominale, rinite sieromucosa ed all'auscultazione del torace si apprezza un murmure vescicolare ubiquitario, aspro, con rumori nasali trasmessi e qualche gemito. A causa della persistente difficoltà osservata all'assunzione dei pasti viene posizionato un sondino naso-gastrico e vengono prescritti pasti di 50 mL ogni 2-3 ore di latte materno spremuto (LMS). Viene inoltre eseguito un EGA capillare (pH 7.27, pCO₂ 43.8 mmHg, pO₂ 30.5 mmHg, HCO₃⁻ 20.3 mmol/L, Na 140 mmol/L, K 6.4 mmol/L, lattato 7.8 mmol/L) che porta alla decisione di intensificare la terapia aerosolica con Ipratropio Bromuro con un'esecuzione ogni 6 ore.

Dopo poche ore, la paziente presenta un peggioramento della dinamica respiratoria con tachipnea (70 atti/minuto), rientramenti sottocostali, tosse ed episodio di vomito mucoso-alimentare. La saturazione è al 98% in cannule nasali 2L/min. All'auscultazione il murmure

vescicolare è ubiquitario, si odono gemiti e crepitii sparsi. Dopo lavaggio nasale viene eseguito un EGA capillare che documenta:

- pH 7.39
- pCO₂ 37.6 mmHg
- pO₂ 53.6 mmHg
- HCO₃⁻ 22.8 mmol/L
- lattato 4 mmol/L
- glucosio 109 mg/dL
- elettroliti nella norma

Viene dunque impostata ossigeno-terapia ad alti flussi tramite nasocannule (HFNC) 10L/min con FiO₂ 50%, a scalare, con miglioramento del quadro nelle ore successive e riduzione della terapia a 8L/min con FiO₂ 30%. Nel frattempo, la ricerca per virus respiratori su tampone nasale ha dato esito positivo per la presenza di Rhinovirus.

Al momento persiste lieve distress respiratorio con saturazione al 96% in HFNC 8L/min con FiO₂ al 30%. Si riduce l'alimentazione tramite sondino a pasti di 20 cc ogni 2 ore ed aumenta la frequenza degli aerosol ad ogni 4 ore. Viene infine ripetuto un EGA capillare di controllo. (pH 7.44, pCO₂ 32.6 mmHg, pO₂ 48.3 mmHg, HCO₃⁻ 22.3 mmol/L, lattato 3.6 mmol/L ed elettroliti di norma).

Il giorno seguente, 7/11, la paziente risulta stabile, non presenta segni di distress respiratorio e, anzi, si documenta un miglioramento della dinamica ed una maggiore reattività. La bambina è stabilmente apiretica dall'ingresso, ha una frequenza cardiaca di 112 bpm ed una saturazione al 96% in HFNC 8L/min FiO₂ al 30%. All'auscultazione del torace si apprezza murmure vescicolare normotrasmeso su tutto l'ambito senza apparenti rumori aggiunti, ma con respiro appoggiato e senza franchi segni di distress respiratorio. Vengono di nuovo controllati gli indici di flogosi con una PCR di 2.01 mg/dL, stabile su valori leggermente rialzati.

L' EGA capillare eseguito in O2-terapia HFNC 8L/min FiO2 30% invece documenta:

- pH 7.44
- pCO2 31.8 mmHg
- pO2 62.7 mmHg
- glicemia 109 mg/dL
- HCO3- 21.9 mmol/L
- Na 137 mmol/L
- K 5.5 mmol/L
- Cl 101 mmol/L

In questa giornata viene successivamente prescritto l'avvio della terapia antibiotica con Ceftriaxone 400mg per os.

Il giorno 8/11 la paziente va incontro a peggioramento clinico, è agitata, pallida e tachipnoica (70 atti/min) con saturazione 97% in HFNC 10L/min con FiO2 al 30% ed è sfebbrata. All'esame obiettivo presenta rientramenti sottocostali e al giugulo e cute pallida-grigiastrea. Murmure vescicolare trasmesso su entrambi i campi polmonari con rumori umidi bronchiali. Toni cardiaci validi, ritmici e tachicardici.

In seguito a lavaggio nasale viene eseguito un ulteriore EGA capillare documentante:

- pH 7.27
- pCO2 35.2 mmHg
- pO2 47.1 mmHg
- HCO3- 13.4 mmol/L
- BE – 10.5
- Lattato 11.4 mmol/L
- Na 136 mmol/L
- Hb 11.7 g/dL
- Glicemia 170 mg/dL

Si posiziona, dunque, un accesso venoso giugulare destro e si avvia infusione glucoeletrolitica 20 mL/h con sospensione dei pasti ed aspirazione del contenuto dello stomaco. Si programma dunque un monitoraggio stretto dei parametri vitali e dell'EGA capillare.

Le condizioni generali della bambina sono a questo punto discrete. La tachipnea è in lieve riduzione (62 atti/min), sempre presenti i rientramenti al giugulo e sottocostali, all'auscultazione del torace si apprezza un murmure vescicolare presente su tutto l'ambito polmonare con l'aggiunta di rumori umidi bilaterali e sibili diffusi. All'EGA capillare, eseguito per monitoraggio, si apprezza un lieve miglioramento (pH 7.35, pCO₂ 33.2 mmHg, pO₂ 50.7 mmHg, HCO₃⁻ 18.5 mmol/L, lattato 8.7 mmol/L, glicemia 158 mg/dL ed elettroliti nei limiti di norma).

A seguito della stabilizzazione del quadro si programma la conversione della terapia antibiotica da os a endovena e l'avvio di terapia aerosolica con adrenalina. Il quadro, in seguito, risulta così essere in lieve miglioramento con saturazione al 95% in HFNC 10L/min con FiO₂ al 30%. Persistenza di respiro addominale e rientramenti diaframmatici e sottocostali. All'auscultazione si apprezza murmure vescicolare aspro bilateralmente con crepitii diffusi. La frequenza respiratoria si stabilizza su 40 atti/min e la frequenza cardiaca su 120 bpm.

La bambina viene dunque rivalutata dai medici della terapia intensiva pediatrica che svolgono un'ecografia polmonare e impostano la seguente terapia:

- frequenti lavaggi nasali con soluzione fisiologica e aspirazione del muco dalle vie aeree superiori
- Ossigenoterapia HFNC 10L/min FiO₂ 30%
- aerosol con adrenalina mezza fiala più 3cc di soluzione fisiologica 4 volte die
- ceftriaxone ev 400 mg/die
- betametasona per os 0.5 mg/die
- infusione glucoelettrolitica 20mL/h
- alimentazione per sondino naso-gastrico 5cc di LMS

Le condizioni della paziente migliorano, è più rosea e reattiva ed i rientramenti sono in riduzione.

Nella notte le condizioni della paziente però peggiorano. Viene effettuata una terapia aerosolica con adrenalina, che ripete a distanza di 30 minuti, contemporaneamente alla somministrazione endovena di metilprednisolone e con successivo aumento dell'ossigenoterapia a 10 L/min a FiO₂ 40%.

La bambina si presenta con cute pallida, tachipnoica, respiro addominale e tempo di refill capillare > 3 secondi. Viene dunque sottoposta all'esecuzione di una radiografia del torace che documenta opacamento pressoché completo dell'emitorace di destra da possibile marcato ingrandimento dell'immagine cardio-mediastinica. Si evidenziano inoltre aspetti di disventilazione parenchimale alla base polmonare di destra e al terzo medio polmonare di sinistra ed assenza di significativi versamenti pleurici.

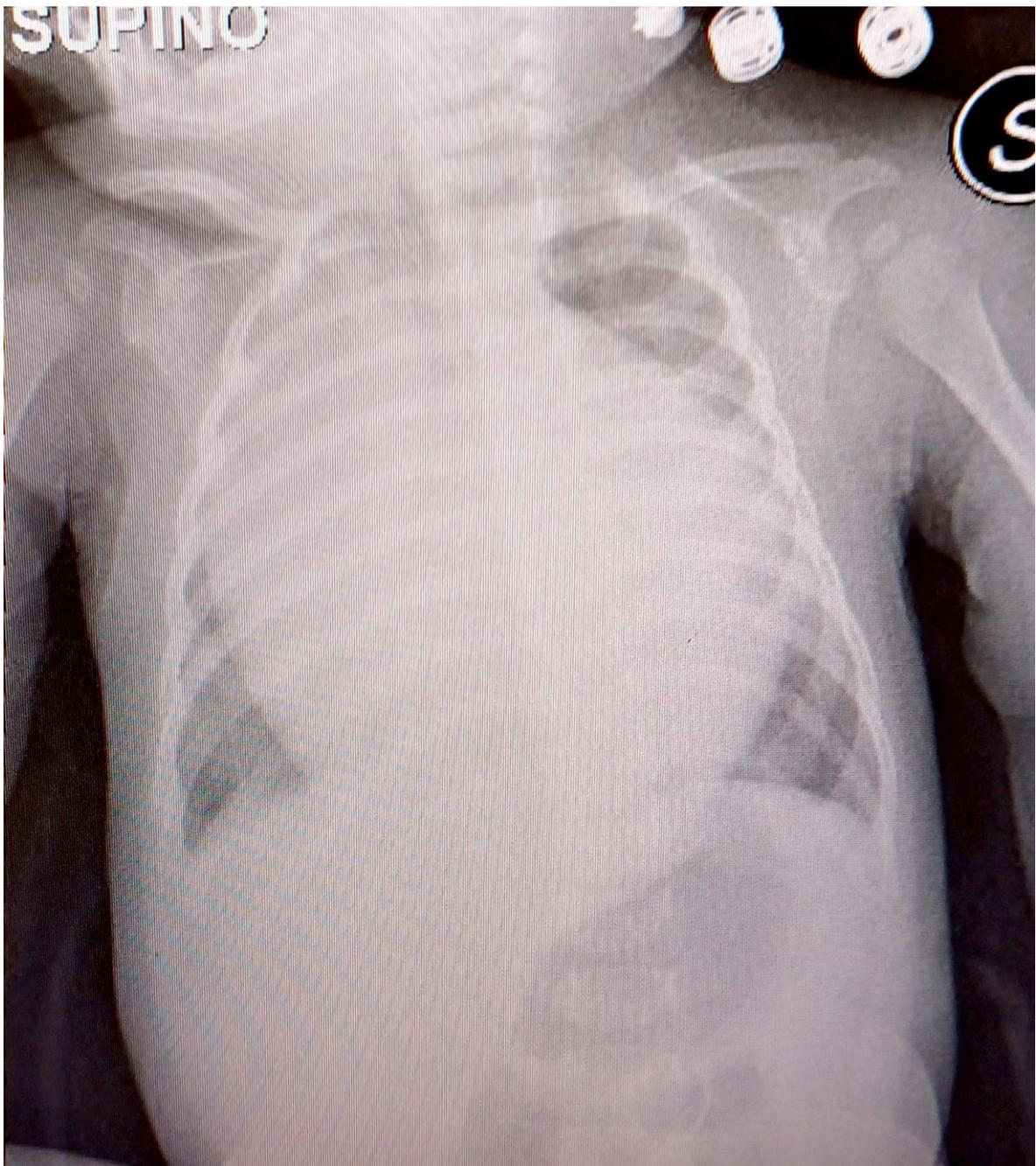


Figura 4: Radiografia del torace a letto, 1P

In considerazione delle condizioni generali notevolmente peggiorate, della necessità di un maggior fabbisogno di ossigeno (12L/min in FiO2 50%) e, in seguito all'esecuzione di un EGA capillare riscontrante un'importante insufficienza respiratoria, di una ecocardiografia e della visualizzazione degli esiti della radiografia del torace si concorda il trasferimento della paziente in terapia intensiva pediatrica.

L'ecocardiografia viene effettuata dai medici della TIN nel sospetto clinico di shock cardiogeno con evidenza di grave ipocinesia ventricolare sinistra e ventricolo sinistro con spessori aumentati e versamento pericardico non tamponante.

Di seguito viene riportato l'EGA capillare, eseguito prima del trasferimento, dai medici della terapia intensiva pediatrica.

| | |
|---------|------------|
| pH | 6.94 |
| pCO2 | 37.9 mmHg |
| pO2 | 85.1 mmHg |
| HCO3- | 8.2 mmol/L |
| Lattato | 21 mmol/L |
| sBE | -24 mmol/L |
| Hb | 9 g/dL |

All'esame obiettivo, eseguito prima del trasferimento, la paziente si presenta dispnoica con rientramenti e segni di affaticamento, un evidente compromissione del circolo con polsi periferici flebili, ipotonica e iporeattiva. Presenta una saturazione al 92% in HFNC 10L/min in FiO2 al 40%, la frequenza cardiaca è di 130 bpm.

Preso atto della gravità del caso e nel sospetto di cardiomiopatia metabolica ipocinetica, viene contattato il presidio ospedaliero Regina Margherita di Torino per la centralizzazione della paziente a seguito della sua stabilizzazione per il trasporto in sicurezza. La lattante viene dunque trasferito in sala RETCAM alle ore 1.30 del 9/11.

Alle ore 1.37 sopraggiunge l'arresto cardiaco e si iniziano le manovre rianimatorie secondo il protocollo PALS per un tempo totale di 41 minuti e la somministrazione di 13 adrenaline senza nessuna ripresa del ritmo. Le manovre vengono interrotte alle 2.12 e si constata il decesso.

Vengono eseguite un'ecocardiografia con rilevamento di un modesto versamento pericardico su cui si esegue una pericardiocentesi con prelievo di scarso liquido sierematico senza nessuna ripresa del ritmo.

Il giorno successivo, il 10/11, la paziente viene sottoposta a riscontro diagnostico presso la S.C.D.U. di Anatomia Patologica di Novara. L'epicrisi definisce come causa iniziale di morte una cardiomiopatia ipertrofica da verosimile malattia da accumulo lisosomiale di glicogeno, come causa intermedia un'atelettasia polmonare bilaterale con focolai alveolitici e come causa finale l'insufficienza respiratoria. Vengono eseguiti in tutto 16 prelievi e rispettive colorazioni durante la procedura. Le biopsie comprendono miocardio, parenchima polmonare, parenchima epatico, parenchima splenico e parenchima renale.

Si prelevano, inoltre, campioni di dimensioni maggiori di fegato, cuore e muscolo psoas. Questi campioni a fresco sono stati successivamente congelati a -80 gradi e, in seguito, utilizzati per estrarre il DNA su cui sono state condotte le indagini genetiche presso la Genetica Medica del medesimo presidio ospedaliero e presso il Policlinico San Matteo di Pavia.

All'esame macroscopico il cuore pesa 102 g, presenta cardiomegalia ed è a struttura deformata. Vi è presenza di versamento pleurico e pericardico di aspetto sierematico di circa 55 cc. Il ventricolo destro ed il sinistro sono ipertrofici, rispettivamente con delle dimensioni di 4 mm e 20 mm.

I polmoni, invece, si presentano sia il destro che il sinistro, diffusamente atelettasici e con un peso di 85 g per il destro e 65 g per il sinistro. Il parenchima polmonare destro presenta inoltre diffuse petecchie asfittiche. La prova docimasica è positiva.

Il timo, a normale struttura, pesa 9 g. Si apprezza inoltre un colon a normale struttura con presenza di residuo del dotto di Aranzio. Il fegato pesa 205 g, la milza, invece, 26 g con polpa ben trattenuta. Il rene destro è del peso di 25 g, mentre, il sinistro è del peso di 28g. Entrambi presentano il limite cortico-midollare conservato.



Figura 5: Cuore della paziente, visione macroscopica.



Figura 6: Visuale macroscopica delle camere cardiache.

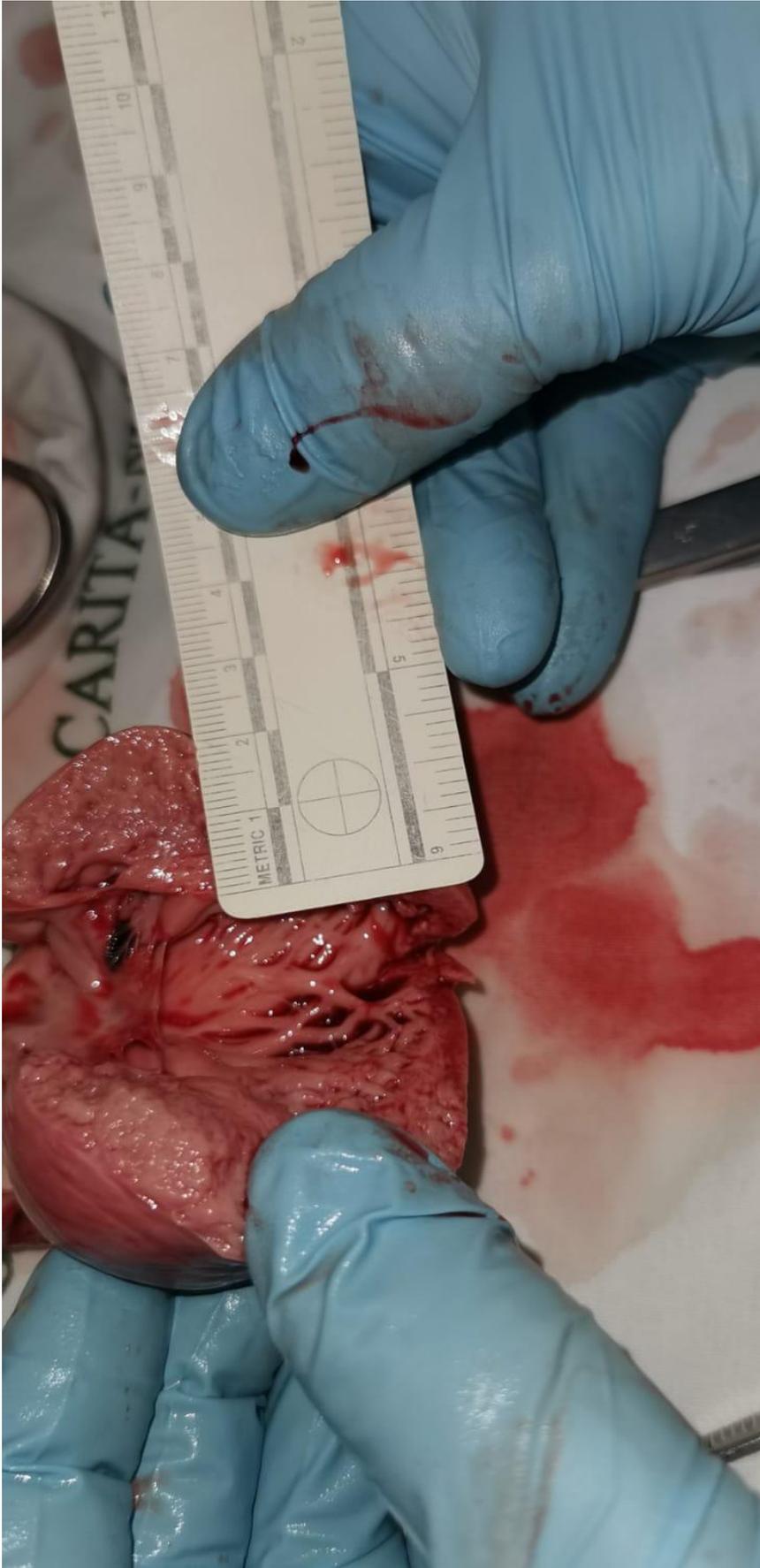


Figura 7: Misurazione dello spessore della parete ventricolare

Segue l'esame microscopico. Le biopsie sono trattate seguendo un protocollo standard per garantire la conservazione ottimale del tessuto e la preparazione adeguata all'analisi microscopica. Le procedure di trattamento sono condotte nel rispetto delle linee guida etiche e normative vigenti.

Per la visualizzazione al microscopio ottico, esse, sono fissate immediatamente dopo il prelievo utilizzando una soluzione di formalina tamponata al 10%. Dopo il periodo di fissazione, le biopsie vengono processate per l'inclusione in paraffina al fine di ottenere blocchi di tessuto solidi e facilmente sezionabili. Vengono quindi disidratate in alcol etilico di concentrazione crescente, chiarificate in xilene e quindi impregnate con paraffina fusa. I blocchi di tessuto sono, dunque, tagliati in sezioni sottili di 5 micron utilizzando un microtomo. Le sezioni vengono quindi montate su lame di vetro adesive e lasciate asciugare a temperatura ambiente per garantire l'adesione ottimale al vetro.

In questo caso, le sezioni di tessuto montate, vengono sottoposte a colorazione con ematossilina ed eosina e PAS seguendo un protocollo standard e, successivamente, analizzate al microscopio ottico.

Il miocardio presenta diffusa vacuolizzazione citoplasmatica nei miocardiociti. La colorazione PAS evidenzia sporadici granuli subsarcolemmali. Si riscontra inoltre la presenza di foci di miocardite.

Il parenchima polmonare presenta una congestione acuta di capillari dei setti interalveolari, atelettasia alveolare e presenza di granulociti endoalveolari.

Il parenchima epatico e quello splenico presentano diffusa congestione vascolare acuta, così come il parenchima renale, dove si evidenziano, inoltre, pseudocisti corticosurrenailche.

L'esame conclude per una cosiddetta cardiomiopatia da degenerazione vacuolare dei cardiomiociti. Tale reperto, specie in relazione al dato ultrastrutturale analizzato in seguito, pone il sospetto diagnostico di glicogenosi di tipo 2, ovvero da accumulo lisosomiale di glicogeno indigerito.

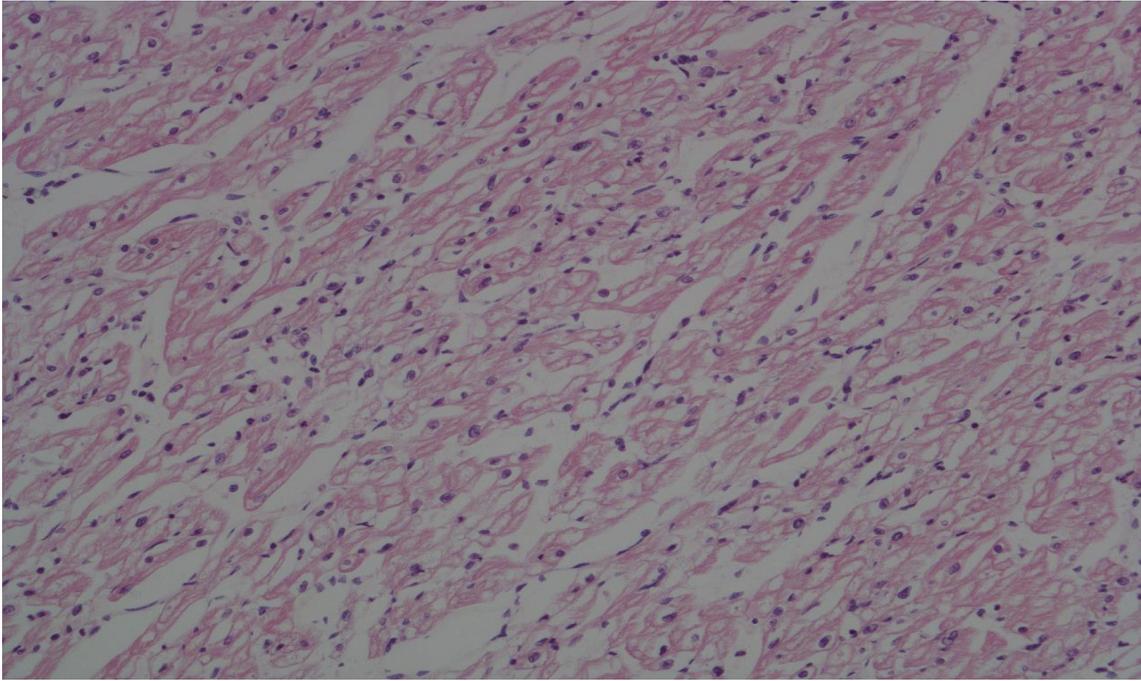


Figura 8: tessuto miocardico, evidente diffusa vacuolizzazione citoplasmatica nei cardiomiociti, colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento a 20x.

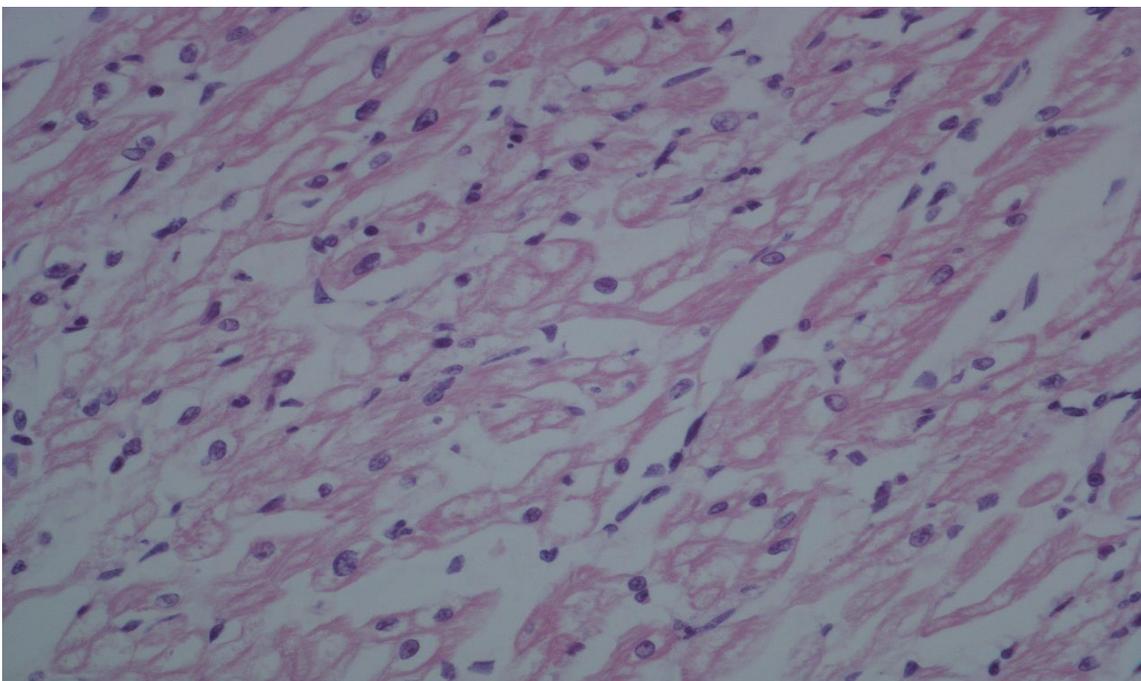


Figura 9: tessuto miocardico, diffusa vacuolizzazione citoplasmatica nei cardiomiociti, colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento a 40x

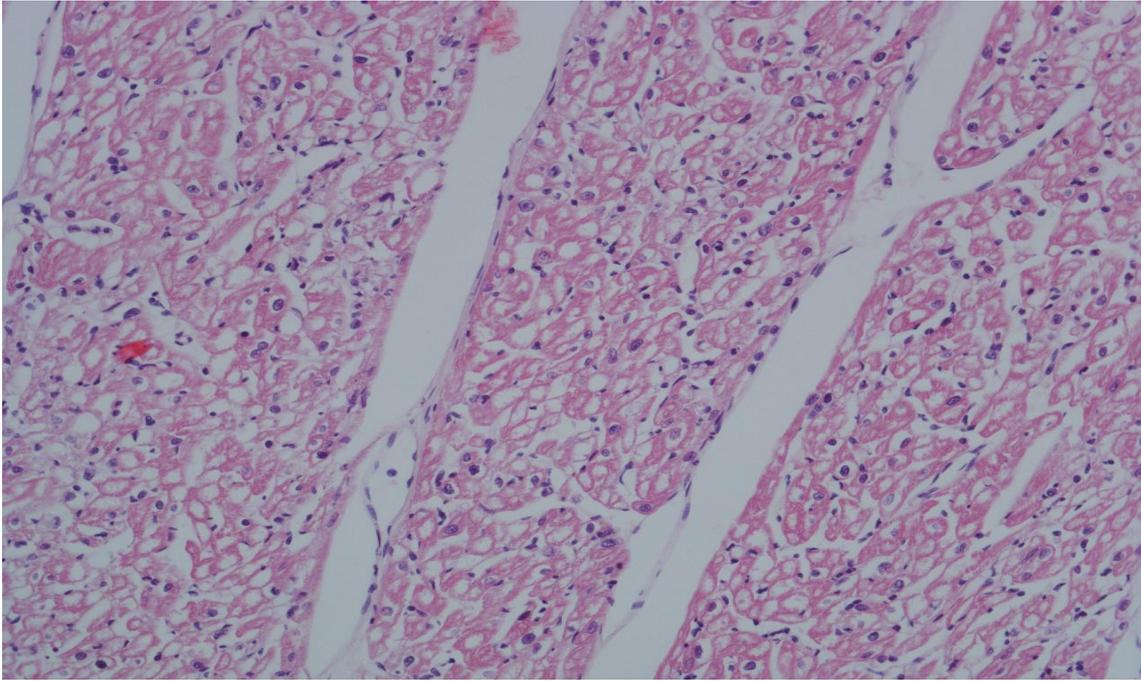


Figura 10: tessuto miocardico, diffusa vacuolizzazione citoplasmatica nei cardiomiociti, colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento a 20x

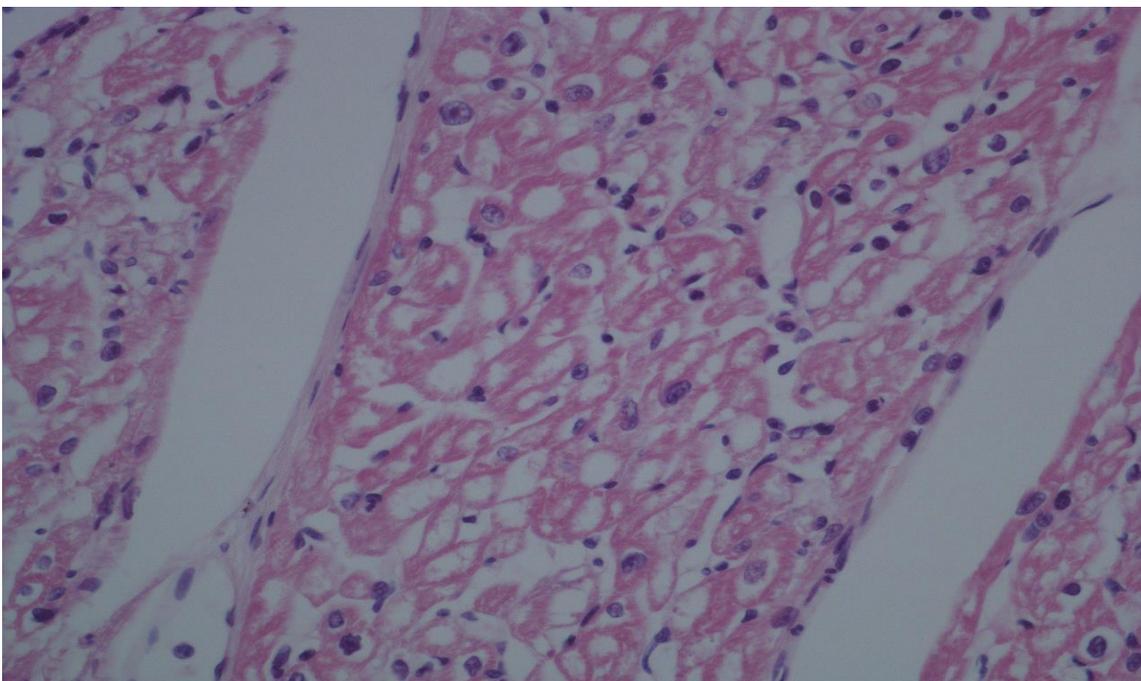


Figura 11: tessuto miocardico, diffusa vacuolizzazione citoplasmatica nei cardiomiociti, colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento a 40x.

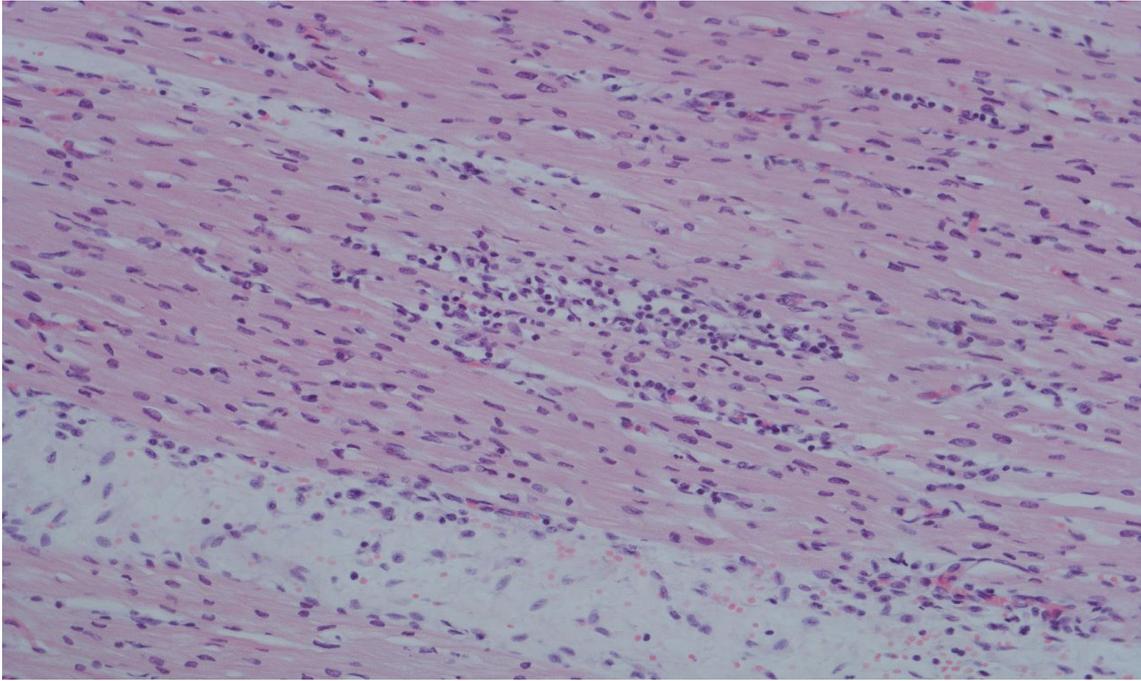


Figura 12: tessuto miocardico, foci di miocardite, colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento a 20x.

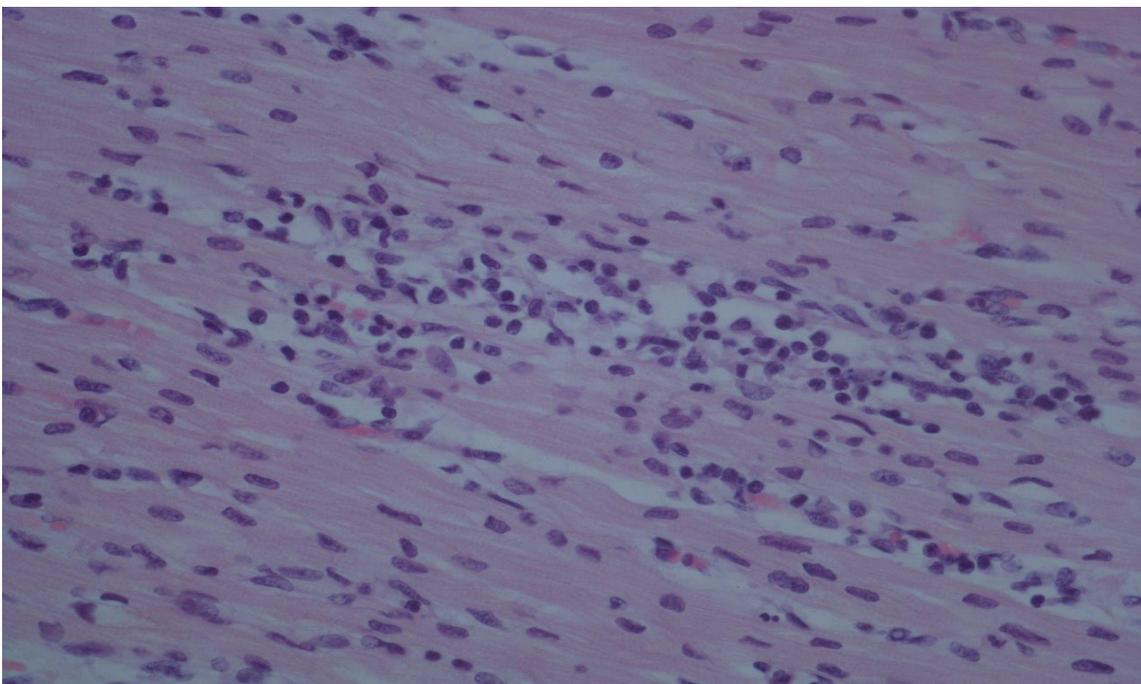


Figura 13: tessuto miocardico, foci di miocardite, colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento a 40x.

I rimanenti campioni sono sottoposti a un trattamento specifico per preservare la morfologia ultrastrutturale dei tessuti e la sua successiva analisi.

I campioni vengono fissati utilizzando una soluzione di glutaraldeide al 2,5% in tampone fosfato pH 7,4. Dopo il periodo di fissazione, sono post-fissate in tetrossido di osmio all' 1% in acqua distillata. Vengono successivamente deidratate in una serie di soluzioni di alcol etilico di concentrazione crescente (dal 50% al 100%) per prepararle all'inclusione in resina. Le biopsie, dunque, sono incluse in resina epossidica a bassa viscosità. I blocchetti inclusi in resina vengono dunque sezionati al microtomo.

Le sezioni semisottili, ottenute dai campioni prelevati, sono state colorate con blu di toluidina e Ematossilina fosfotungstica (PTAH). Le sezioni ultra-sottili (70 nm) sono trattate con uranile acetato e citrato di piombo. Le biopsie, così trattate, sono pronte per l'analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Quest'ultima risulta fondamentale ai fini di una corretta diagnosi in quanto in grado di poter evidenziare gli accumuli di granuli di glicogeno all'interno dei lisosomi. Vengono infatti trovate alcune immagini compatibili con accumuli di glicogeno in vacuoli, con granuli monoparticolati di circa 20-30 nm di diametro, simili a beta-glicogeno. A seguito sono riportate le immagini ottenute dall'indagine ultrastrutturale.

Vengono inoltre riscontrati aspetti di difficile interpretazione, non conformi a una diagnosi certa di malattia di Pompe:

- vacuoli paranucleari con accumuli di fibrille composte da granuli di 25 nm, insieme a granuli sparsi.
- Vacuoli paranucleari con accumuli granulofibrillari di dimensioni inferiori (diametro circa 6-7 nm)
- Accumuli di mitocondri, anche questi in genere paranucleari, con alterazioni di dimensioni e delle creste, sebbene difficilmente valutabili in un contesto di artefatti autoptici.
- Cellule muscolari plurinucleate, compatibili forse con l'età della paziente.

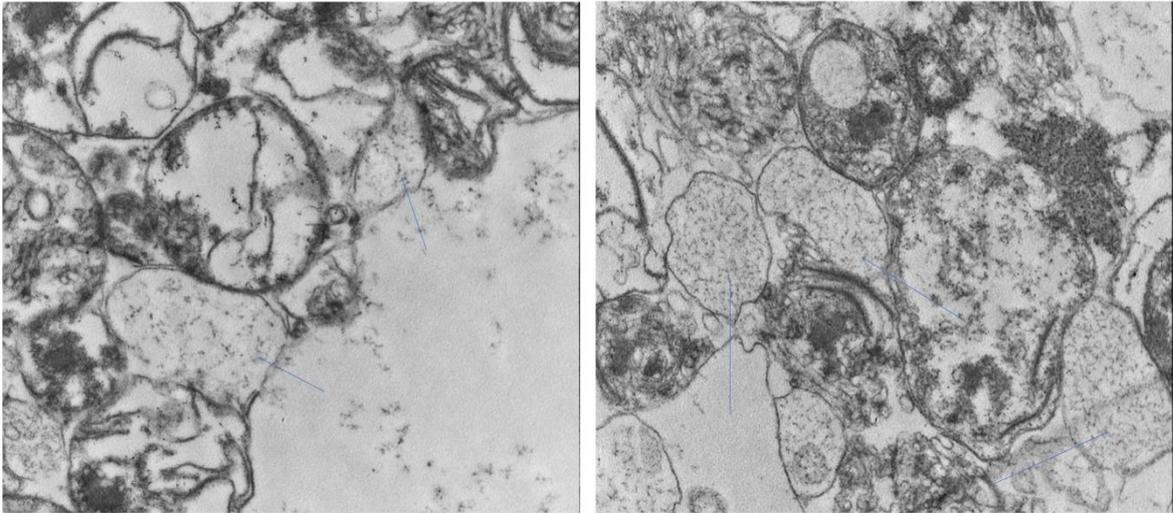


Figura 14: Glicogeno in vescicole con diametro circa di 25 nm (figura a sinistra) ed accumuli in vescicole granulo-fibrillari di circa 6-7 nm di diametro, ingrandimento a x20000.

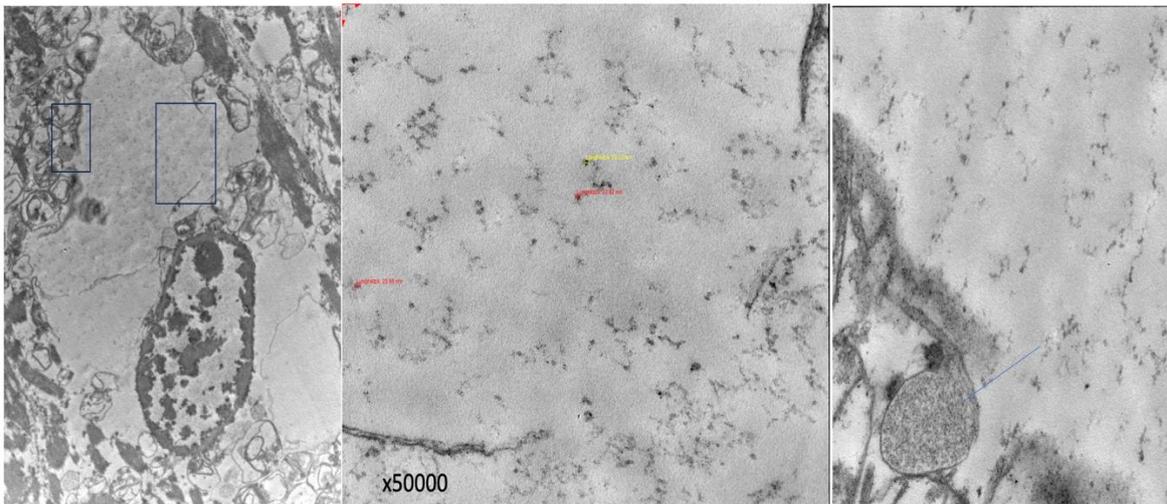


Figura 15: Focali cellule che contengono materiale granulare e fibrillare a diametro di circa 20-25 nm. Si osservano anche focali vacuoli a contenuto granulare fine di diametro circa 6 nm (freccia blu), ingrandimento a x50000.

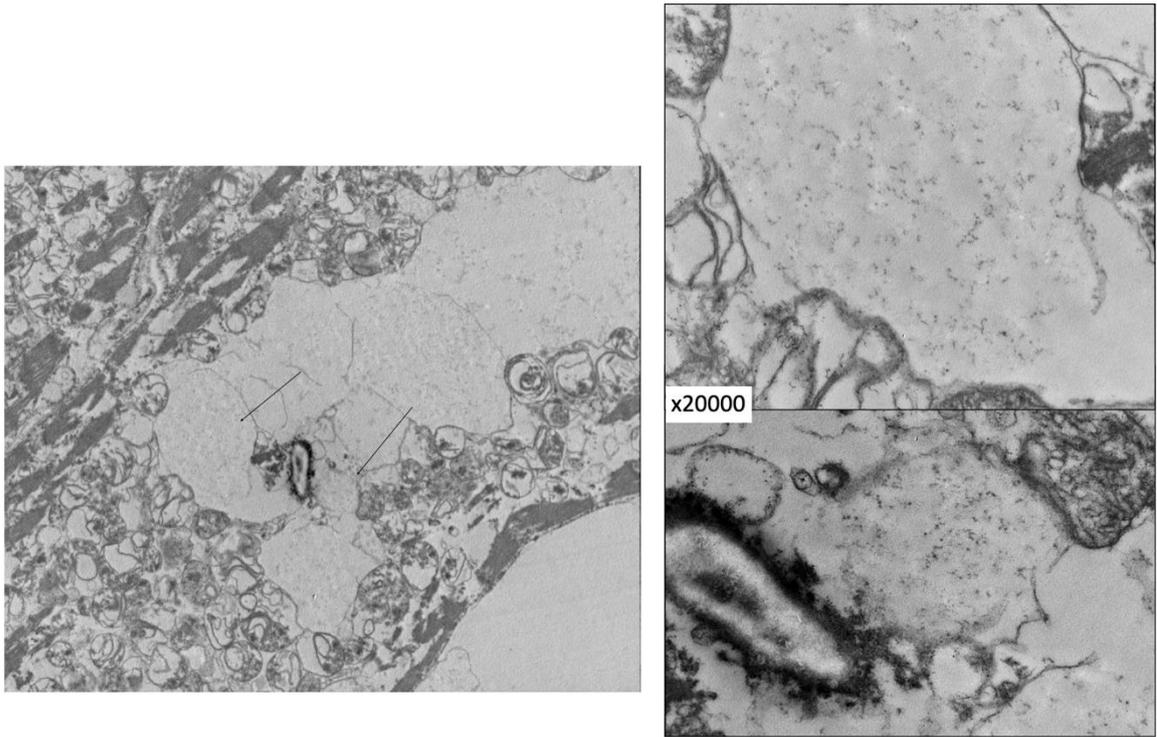


Figura 16: Granuli e fibrille in vescicole, diametro 20-25 nm, ingrandimento a x20000

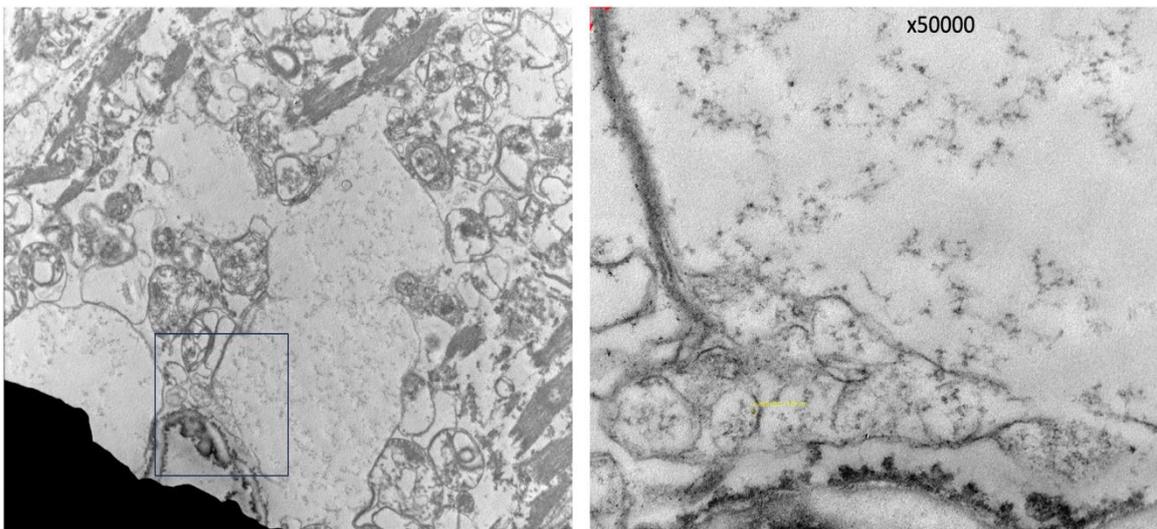


Figura 17: Accumuli granulari fibrillari di diametro 20-25 nm, compatibili con glicogeno, ingrandimento a x50000.

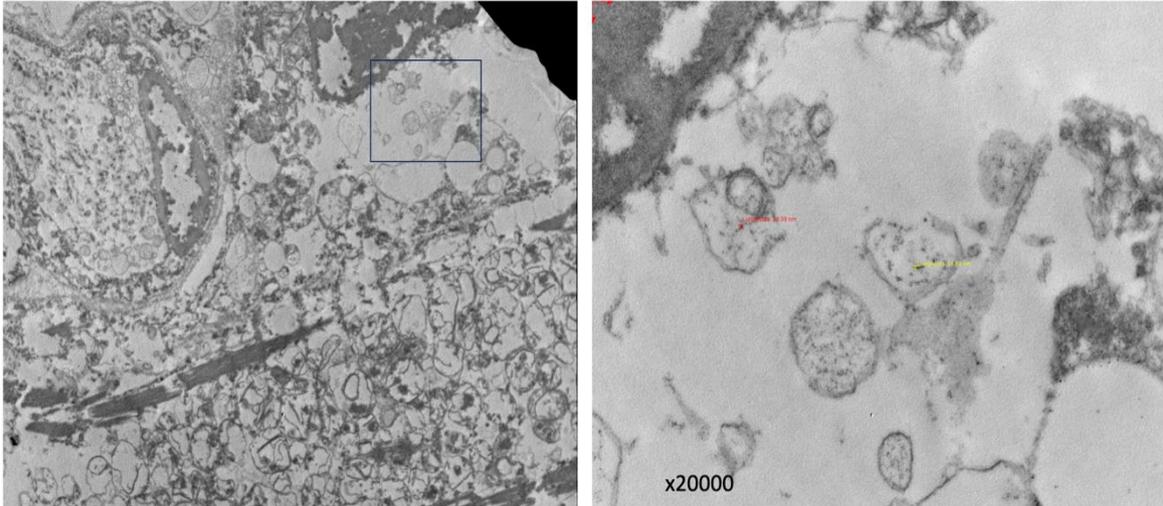


Figura 18: Vacuoli con sparsi granuli di circa 25nm, ingrandimento a x20000.

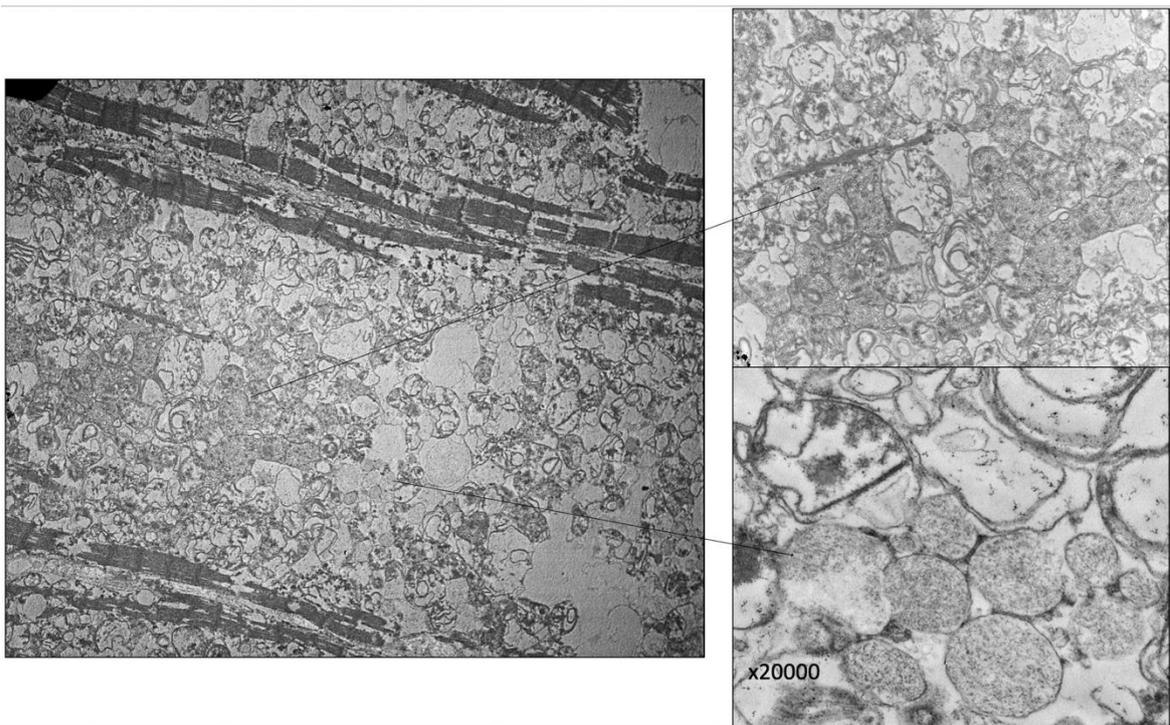


Figura 19: Mitocondri e vacuoli a contenuto granulo-fibrillare fine, diametro circa 6 nm, ingrandimento a x20000.

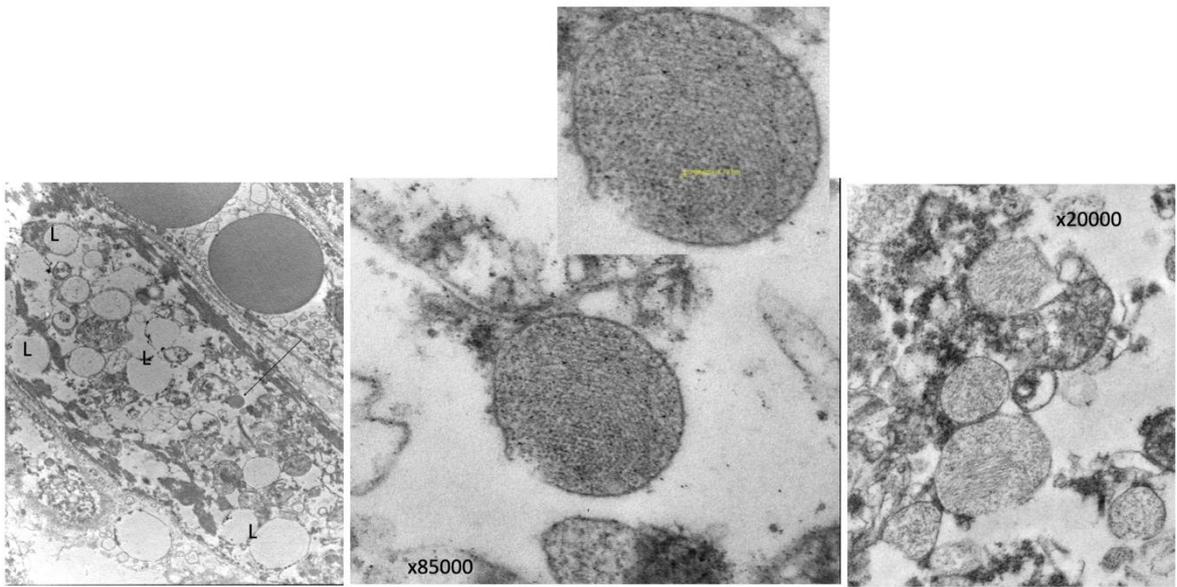


Figura 20: Vescicole a contenuto granulo-fibrillare di 6-7 nm di diametro, ingrandimento a x85000 e x20000.

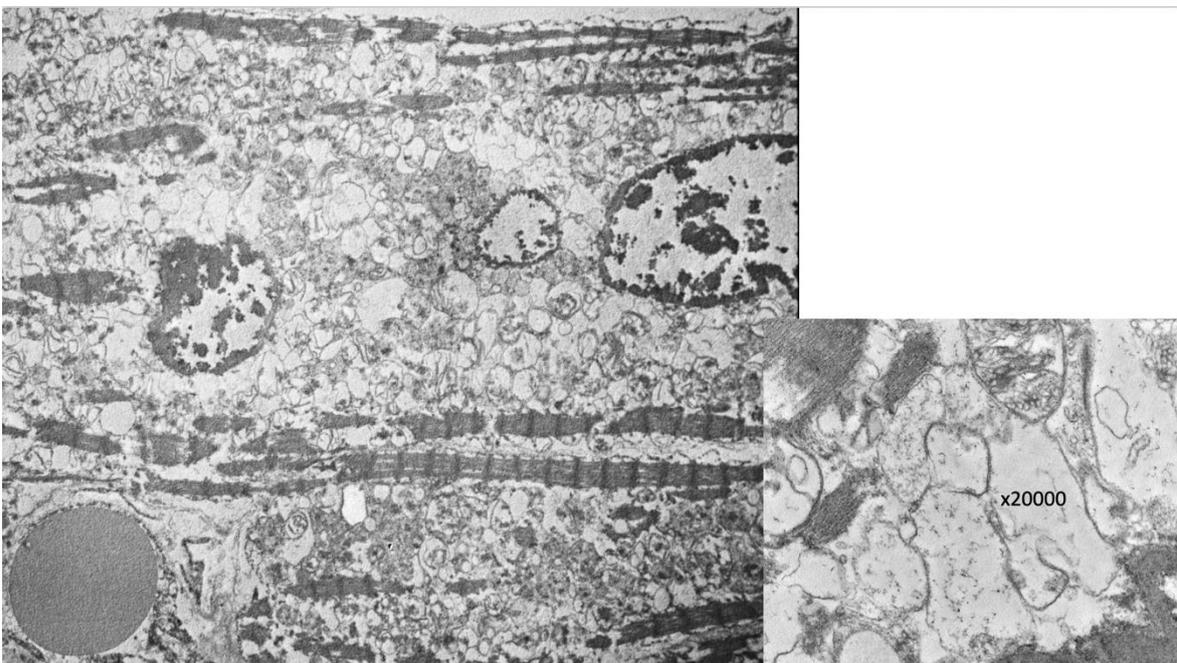


Figura 21: cellula plurinucleata con vacuoli a contenuto granulo-fibrillare, ingrandimento a x20000.

Dai campioni freschi congelati a -80 gradi, comprendenti fegato, cuore e muscolo psoas, si è estratto il DNA della paziente, successivamente utilizzato per le indagini genetiche presso la Genetica Clinica dell'A.O. U. Maggiore della Carità di Novara.

L'estrazione del DNA da tessuto fresco congelato viene eseguita tramite Maxwell® RSC Tissue DNA Kit di Promega. La tecnica di estrazione utilizzata prevede l'utilizzo di biglie magnetiche. In primo luogo, si è proceduto con la lisi cellulare (meccanica e non) del campione in modo da liberare gli acidi nucleici. La preparazione e la procedura vengono dunque effettuate seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

Si sono ottenute in questo modo tre provette differenti contenenti il DNA estratto da fegato, cuore e muscolo psoas.

Le successive fasi di studio sono condotte presso i laboratori di Genetica Clinica presso cui vengono inviati i campioni precedentemente trattati. L'obiettivo dell'analisi è quello di predisporre un esoma clinico della paziente, in tal modo, si potranno andare a rilevare le mutazioni puntiformi, possibilmente presenti, nella porzione esonica del genoma della paziente, ovvero quella parte di DNA di cui sono conosciute la maggior parte delle varianti mutazionali patogenetiche.

Il processo inizia con la quantificazione del DNA estratto effettuata utilizzando il fluorimetro Qubit 4. Questo strumento permette una misurazione precisa della concentrazione di DNA, garantendo l'adeguatezza del campione per le successive fasi di analisi, è infatti fondamentale che la concentrazione di DNA non sia troppo elevata. Nel nostro caso abbiamo utilizzato il campione proveniente dal fegato, il quale, presenta una concentrazione di 40 ng/ μ L.

Successivamente si passa alla procedura che viene identificata come Target Enrichment. Nel nostro caso viene utilizzato il sistema Magnis NGS Prep System di Agilent, seguendo il protocollo SSEL-DNA-XTHS2-EPIS-ILM. Questo protocollo prevede diverse fasi critiche:

- Il DNA viene frammentato in piccoli pezzi e vengono aggiunti adattatori specifici (sequenze di DNA necessari per i legami ai supporti di sequenziamento e per l'amplificazione tramite PCR) alle estremità dei frammenti per preparare le librerie di DNA.
- Le sonde biotinate (probes) specifiche per gli esoni target vengono ibridate con i frammenti di DNA. Queste sonde sono progettate per legarsi specificamente alle regioni esoniche di interesse.

- Le sonde ibridate, ora legate ai frammenti target, vengono catturate utilizzando il principio delle biglie magnetiche. Questo permette di isolare i frammenti di DNA target dal resto del DNA genomico.

- Infine, i frammenti così ottenuti vengono poi amplificati tramite PCR per ottenere una quantità sufficiente di materiale per il sequenziamento. Questo passaggio include anche fasi di purificazione per rimuovere eventuali contaminanti.

La qualità delle librerie ottenute viene valutata utilizzando 4150 TapeStation System di Agilent. Questo strumento fornisce una valutazione dettagliata dell'integrità e della dimensione dei frammenti di DNA, assicurando che solo campioni di alta qualità vengano utilizzati per il sequenziamento.

Infine, il sequenziamento delle librerie di DNA è eseguito con il sistema NextSeq 1000 di Illumina. Il processo utilizzato è il sequenziamento per sintesi. Sono stati così ottenuti i dati grezzi, i quali, necessitano di ulteriori fasi bioinformatiche per poter essere analizzati.

Si giunge, quindi, all'esame finale dei dati dell'esoma clinico, al fine di ricercare potenziali mutazioni patogenetiche.

La famiglia della paziente, invece, è stata seguita presso l'Unità di Genetica Medica del Policlinico San Matteo di Pavia. I genitori, e tutti i fratelli, sono stati indirizzati ad una consulenza genetica ed hanno eseguito la ricerca di potenziali varianti patogenetiche su un pannello di geni correlati con le cardiomiopatie. Gli esiti preliminari hanno quindi constatato il rilevamento di varianti geniche non inerenti con patologie di accumulo e con malattia di Pompe. Sono state riscontrate, in particolare, delle varianti del gene *Ryr* (gene che trascrive per il recettore della rianodina) in entrambi i genitori; tuttavia, queste ultime rimangono di significato incerto e la correlazione con la patologia della figlia non può essere confermata.

Sia nel DNA della bambina che nel DNA materno è stata rinvenuta variante non-sinonima in eterozigosi nell'esone 15 del gene *SCN5A* (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5) c.2371C>T che determina la sostituzione aminoacidica della Leucina in posizione 791 della proteina con Fenilalanina (p.Leu791Phe). Questa variante è riportata nei database dei polimorfismi con una frequenza molto bassa (>0.1%; 1/ 249.176 gnomAD Exomes) è localizzata nel dominio funzionale "Ion transport" della proteina ed è predetta di significato incerto secondo le linee guida dell'ACMG Laboratory Practice Working Group.⁴¹

Varianti patogenetiche in eterozigosi del gene SCN5A sono associate a diverse cardiomiopatie, tra cui la Sindrome di Brugada, Sindrome del QT lungo e cardiomiopatia dilatativa.

L'analisi dell'esoma clinico della bambina, effettuata a Novara, ha rilevato, inoltre, la presenza della variante non-sinonima in omozigosi nell'esone 21 del gene ELAC2 (elaC ribonucleasi Z 2) c.1977G>C che determina la sostituzione amminoacidica del Triptofano in posizione 659 della proteina con Cisteina (p.Trp659Cys). Questa variante non è presente nei database dei polimorfismi (dbSNP, 1000 Genomes Project, ExAC Browser, ESP, gnomAD), è classificata di significato incerto secondo le linee guida dell'ACMG Laboratory Practice Working Group⁴¹ e si trova nel dominio funzionale "Metallo-beta-lattamasi" della proteina. Varianti patogenetiche in omozigosi nel gene ELAC2 sono causative di difetto combinato della fosforilazione ossidativa, tipo 17, una malattia genetica rara dei mitocondri causata da un'alterazione della sintesi proteica mitocondriale, caratterizzata da cardiomiopatia ipertrofica grave ad esordio neonatale (che occasionalmente progredisce in una cardiomiopatia dilatativa), associata a ritardo della crescita e dello sviluppo globale, ipotonia muscolare e livelli elevati di lattato nel siero; la biopsia dei muscoli scheletrici evidenzia un deficit del complesso I. I pazienti possono presentare anche disabilità intellettiva, versamento pericardico e un fenotipo cardiaco non grave. La trascrizione del genoma mitocondriale genera grandi trascritti policistronici punteggiati dai 22 tRNA mitocondriali. Questi ultimi vengono convenzionalmente clivati dal complesso RNasi P e dall'attività RNasi Z di ELAC2, rispettivamente agli estremi 5' e 3'. Sono stati infatti osservati accumuli di precursori di tRNA mitocondriale nei muscoli e nei fibroblasti degli individui affetti dalla mutazione.⁴²

Il fenotipico clinico presentato dalla bambina, insieme al fatto che la variante è presente in omozigosi, suggerisce il forte sospetto che quest'ultima possa essere la mutazione causante la patologia.

Tuttavia, per avere la conferma e porre così diagnosi sono necessari altri test sulla famiglia della paziente, con lo scopo di ricercare questa variante in eterozigosi nei genitori e nei fratelli sani.

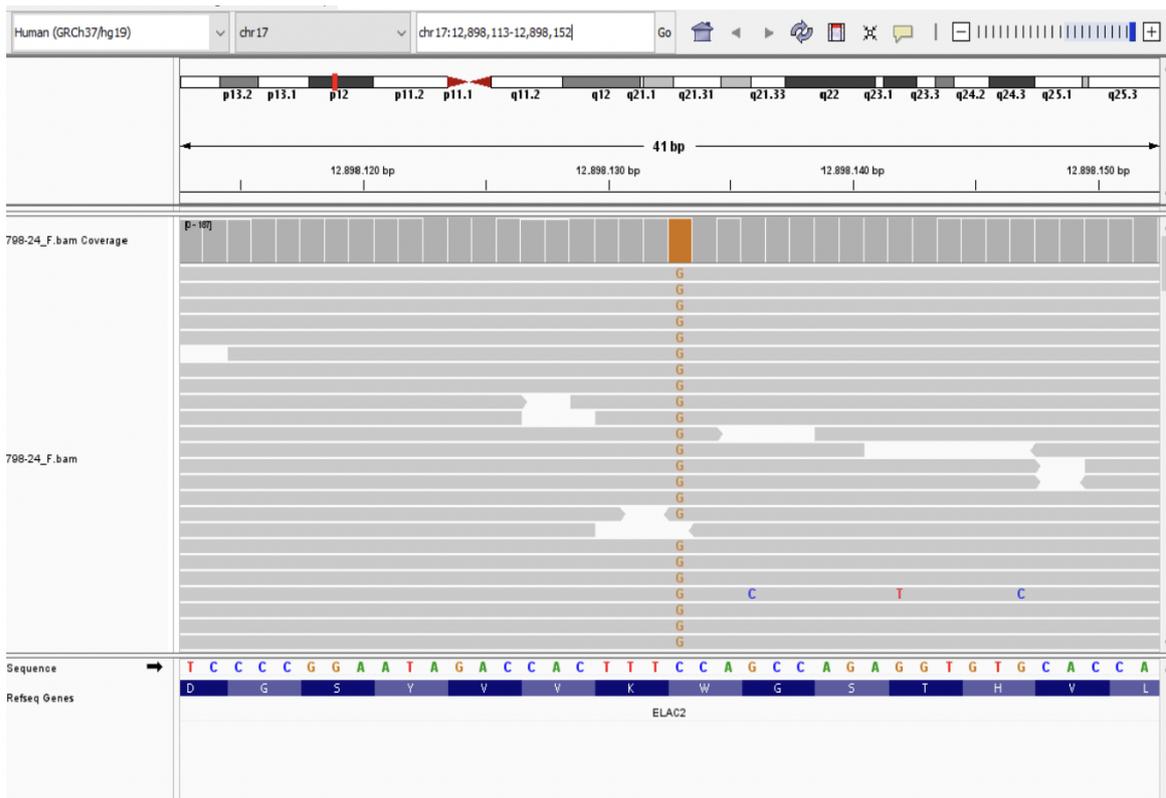


Figura 22: Risultato del sequenziamento con metodica NGS, variante non-sinonima in omozigosi nell'esone 21 del gene ELAC2 c.1977G>C che determina la sostituzione amminoacidica del Triptofano in posizione 659 della proteina con Cisteina (p.Trp659Cys).

4.DISCUSSIONE

Le cardiomiopatie ipertrofiche in età pediatrica, pur essendo condizioni cliniche rare, rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie da cause molteplici che includono: mutazioni in geni sarcomerici, errori congeniti nel metabolismo (malattie da accumulo di glicogeno), malattie da accumulo lisosomiale, alterazioni nell'ossidazione degli acidi grassi, malattie neuromuscolari, sindrome malformative e, infine, malattie mitocondriali.¹

L'età di presentazione, molto spesso, orienta verso una specifica causa di cardiomiopatia ipertrofica e, inoltre, riveste un ruolo prognostico. Ad esempio, le cardiomiopatie ipertrofiche con presentazione clinica prima dell'anno di età mostrano una prognosi infausta e sono principalmente causate da errori nel metabolismo, sindromi malformative o, più raramente, malattie mitocondriali. Al contrario mutazioni in geni sarcomerici rappresentano la più importante causa di cardiomiopatia ipertrofica al di fuori dell'età infantile, con prognosi più favorevole.^{1,2}

Il caso che abbiamo qui descritto, si riferisce ad una paziente di quattro mesi, nata da genitori consanguinei e con in anamnesi una storia familiare riferita di un altro decesso per morte improvvisa cardiaca in una sorella, all'età di tre mesi. Inoltre, lo screening ecocardiografico effettuato su altri tre fratelli (due di sesso maschile ed uno di sesso femminile) ha rilevato la presenza di un ispessimento del setto interventricolare in una sorella. Questi dati hanno portato a ritenere che fosse presente una alterazione su base genetica che potesse spiegare il quadro clinico della paziente e le caratteristiche del contesto familiare.

L'esame autoptico ha rilevato, infatti, la presenza di una marcata cardiomegalia principalmente legata ad un ispessimento del ventricolo sinistro; l'esame istologico ha evidenziato la presenza di fibrocellule muscolari cardiache ipertrofiche e di aspetto vacuolizzato. È stato inoltre effettuato esame ultrastrutturale su prelievi autoptici e, per conseguenza, non scervi da artefatti autolitici, il quale, ha comunque evidenziato la presenza di accumuli di glicogeno in sede lisosomiale, nonché di granuli citoplasmatici e di alterazioni della forma dei mitocondri e delle creste mitocondriali, questi ultimi di natura non specifica a seguito degli artefatti post mortem.

Questo quadro, così descritto, ci ha inizialmente orientato verso una forma di disordine metabolico, nello specifico da accumulo di glicogeno intralisosomiale, quale quello riportato nella malattia di Pompe o glicogenosi di tipo 2. Tale patologia risulta, infatti, associata a cardiomiopatia ipertrofica in combinazione con accumulo di glicogeno a livello sistemico.³⁵ Tale patologia è stata comunque esclusa sia in relazione al fatto che sarebbe sfuggita a uno screening neonatale, che la paziente ha effettuato presso la clinica pediatrica, sia sulla base dell'assenza di mutazioni del gene GAA, codificante per la maltasi acida lisosomiale, in seguito a sequenziamento esomico effettuato sul DNA, estratto da tessuto, presso la Genetica Medica dell'AOU Maggiore della Carità. L'indagine genetica ha, viceversa, evidenziato una mutazione in omozigosi del gene ELAC2, non precedentemente riportata in letteratura e non presente nei database dbSNP, 1000 Genomes Project, ExAC Browser, ESP, gnomAD.

Come sopra riportato, tale gene codifica per una proteina che svolge un ruolo essenziale nella processazione dei tRNA mitocondriali e nella loro maturazione, mediante la sua attività di RNasi Z. Tale proteina è essenziale nel mantenimento del processo di fosforilazione ossidativa mitocondriale, in particolar modo una sua mutazione è correlata a deficit del complesso I della catena della respirazione.⁴²

Come riportato in letteratura, infatti, individui con mutazioni di ELAC2 presentano difetti nella catena respiratoria mitocondriale con sintomi correlati di presentazione come un importante acidosi lattica persistente.^{42,43} Il caso qui rappresentato presentava proprio questa situazione, tanto che, al momento del decesso, il livello plasmatico di lattato risultava essere di 21 mmol/L, inspiegabilmente molto elevato, associata ad un pH di 6,94.

I dati della letteratura, relativi a pazienti con mutazioni di ELAC2, riportano nella quasi totalità dei casi una cardiomiopatia ipertrofica, con decesso compreso tra due e quattordici mesi, con una mediana intorno ai quattro, indicando così una condizione patologica di estrema gravità, sostanzialmente non compatibile con la sopravvivenza.⁴³

Sulla base dei dati qui riportati sembrerebbe logico attendersi la presenza di mutazioni in eterozigosi in entrambi i genitori e, a questo scopo, è in corso l'analisi genetica mirata all'identificazione di varianti geniche in ELAC2 nella famiglia della bambina.

Il sequenziamento esomico ha inoltre evidenziato una mutazione in eterozigosi del gene SCN5A, che codifica per la subunità alfa del canale del sodio cardiaco, responsabile per l'eccitabilità cardiaca e la conduzione dello stimolo elettrico attraverso il cuore.⁴⁴ Se questa

mutazione, riscontrata anche nella madre, possa essere responsabile o corresponsabile della morte cardiaca è ipotizzabile, ma non concretamente dimostrabile.

5.CONCLUSIONE

Il caso da noi descritto rappresenta un esempio di diagnosi integrata: clinica, di imaging, anatomo-patologica (sia con tecnica istologica convenzionale sia ultrastrutturale) e, soprattutto, genetica. Il tutto reso possibile anche grazie al prelievo mirato di campioni di organi immediatamente conservati e congelati a -80 gradi.

Ovviamente l'analisi genetica effettuata sull'intero esoma, e non solo ricercando le più frequenti cause di cardiomiopatia ipertrofica pediatrica, consente, in mani esperte, di identificare e interpretare mutazioni geniche che, correlate alla clinica, e al quadro macro e microscopico anatomo-patologico, inquadrano correttamente la causa della patologia.

Come intuibile, tutto ciò non ha unicamente un significato speculativo, ma risulta assai utile in termini di consulenza genetica per identificare altri membri della famiglia potenzialmente affetti o portatori di tali patologie.

È inoltre prevedibile che molte cause di cardiomiopatia ipertrofica in età pediatrica non siano tutt'ora riconosciute, e che, limitandosi unicamente ad uno screening neonatale delle patologie più frequenti, si possa sottostimare la presenza di altre cause, talora potenzialmente trattabili.

6.BIBLIOGRAFIA

1. 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration with the American Association for Thoracic Surgery, American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Failure Society of America. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(25). doi:10.1016/j.jacc.2011.06.011
2. Lipshultz SE, Law YM, Asante-Korang A, et al. Cardiomyopathy in Children: Classification and Diagnosis: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;140(1):E9-E68. doi:10.1161/CIR.0000000000000682
3. Nguyen MB, Mital S, Mertens L, et al. Pediatric Hypertrophic Cardiomyopathy: Exploring the Genotype-Phenotype Association. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(5). doi:10.1161/JAHA.121.024220
4. Francisco J. Alvarado 1 J. Martijn Bos, 2, 3 Zhiguang Yuchi, 4 Carmen R. Valdivia, 1 Jonathan J. Hernández, 5 Yan-Ting Zhao, 6 Dawn S. Henderlong, 7 Yan Chen, 7 Talia R. Booher, 1 Cherisse A. Marcou, 3 Filip Van Petegem, 8 Michael J. Ackerman, 2, 3, 9 and Héctor H. Valdivia1. Cardiac hypertrophy and arrhythmia in mice induced by a mutation in ryanodine receptor 2. *JCI Insight*. Published online 2019.
5. Perera RM, Zoncu R. The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2016;32:223-253. doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125125
6. Parenti G, Medina DL, Ballabio A. The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO Mol Med*. 2021;13(2). doi:10.15252/emmm.202012836
7. V. Kumar, A.K. Abbas, J.C. Aster. *Le Basi Patologiche Delle Malattie*. 9th ed. (Edra, ed.); 2017.
8. Mehta A, Sunder-Plassmann G, Beck M. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. (Oxford Pharmagenesis, ed.); 2006.
9. Mistry PK, Kishnani P, Wanner C, et al. Rare lysosomal disease registries: lessons learned over three decades of real-world evidence. *Orphanet J Rare Dis*. 2022;17(1). doi:10.1186/s13023-022-02517-0

10. Peters H, Ellaway C, Nicholls K, Reardon K, Szer J. Treatable lysosomal storage diseases in the advent of disease-specific therapy. *Intern Med J.* 2020;50(S4):5-27. doi:10.1111/imj.15100
11. Soon GST, Torbenson M. The Liver and Glycogen: In Sickness and in Health. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7). doi:10.3390/ijms24076133
12. David L. Nelson, Michael M. Cox. *I Principi Di Biochimica Di Lehninger.* 7th ed. (Zanichelli, ed.); 2018.
13. Gümüş E, Özen H. Glycogen storage diseases: An update. *World J Gastroenterol.* 2023;29(25):3932-3963. doi:10.3748/wjg.v29.i25.3932
14. Muzetti JH, do Valle DA, Santos MLSF, Telles BA, Cordeiro ML. Neurological Characteristics of Pediatric Glycogen Storage Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12. doi:10.3389/fendo.2021.685272
15. Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics.* 2018;15(4):928-942. doi:10.1007/s13311-018-0655-y
16. Meena NK, Raben N. Pompe disease: New developments in an old lysosomal storage disorder. *Biomolecules.* 2020;10(9):1-19. doi:10.3390/biom10091339
17. Meena NK, Raben N. Pompe disease: New developments in an old lysosomal storage disorder. *Biomolecules.* 2020;10(9):1-19. doi:10.3390/biom10091339
18. Gragnaniello V, Pijnappel PWWM, Burlina AP, et al. Newborn screening for Pompe disease in Italy: Long-term results and future challenges. *Mol Genet Metab Rep.* 2022;33. doi:10.1016/j.ymgmr.2022.100929
19. Sawada T, Kido J, Nakamura K. Newborn screening for pompe disease. *Int J Neonatal Screen.* 2020;6(2). doi:10.3390/ijns6020031
20. Wang RY. A newborn screening, presymptomatically identified infant with late-onset pompe disease: Case report, parental experience, and recommendations. *Int J Neonatal Screen.* 2020;6(1). doi:10.3390/ijns6010022
21. Bay LB, Denzler I, Durand C, et al. Infantile-onset Pompe disease: Diagnosis and management. *Arch Argent Pediatr.* 2019;117(4):271-278. doi:10.5546/aap.2019.eng.271
22. Xi H, Li X, Ma L, Yin X, Yang P, Zhang L. Infantile Pompe disease with intrauterine onset: a case report and literature review. *Ital J Pediatr.* 2022;48(1). doi:10.1186/s13052-022-01379-3
23. Martínez M, Romero MG, Guereta LG, et al. Infantile-onset Pompe disease with neonatal debut: A case report and literature review. *Medicine (United States).* 2017;96(51). doi:10.1097/MD.00000000000009186

24. Chen LR, Chen CA, Chiu SN, et al. Reversal of Cardiac Dysfunction after Enzyme Replacement in Patients with Infantile-Onset Pompe Disease. *Journal of Pediatrics*. 2009;155(2). doi:10.1016/j.jpeds.2009.03.015
25. Byrne BJ, Colan SD, Kishnani PS, et al. Cardiac responses in paediatric Pompe disease in the ADVANCE patient cohort. *Cardiol Young*. 2022;32(3):364-373. doi:10.1017/S1047951121002079
26. van Capelle CI, Poelman E, Frohn-Mulder IM, et al. Cardiac outcome in classic infantile Pompe disease after 13 years of treatment with recombinant human acid alpha-glucosidase. *Int J Cardiol*. 2018;269:104-110. doi:10.1016/j.ijcard.2018.07.091
27. Jones HN, Muller CW, Lin M, et al. Oropharyngeal dysphagia in infants and children with infantile Pompe disease. *Dysphagia*. 2010;25(4):277-283. doi:10.1007/s00455-009-9252-x
28. Byrne BJ, Kishnani PS, Case LE, et al. Pompe disease: Design, methodology, and early findings from the Pompe Registry. *Mol Genet Metab*. 2011;103(1):1-11. doi:10.1016/j.ymgme.2011.02.004
29. Kishnani PS, Beckemeyer AA, Mendelsohn NJ. The New Era of Pompe Disease: Advances in the Detection, Understanding of the Phenotypic Spectrum, Pathophysiology, and Management. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2012;160:1-7. doi:10.1002/ajmc.31324
30. Fernandes SA, Khan AA, Boggs T, et al. Quantitative whole-body magnetic resonance imaging in children with pompe disease: Clinical tools to evaluate severity of muscle disease. *JIMD Rep*. 2021;57(1):94-101. doi:10.1002/jmd2.12174
31. Fatehi F, Ashrafi MR, Babae M, et al. Recommendations for Infantile-Onset and Late-Onset Pompe Disease: An Iranian Consensus. *Front Neurol*. 2021;12. doi:10.3389/fneur.2021.739931
32. Werneck LC, Lorenzoni PJ, Kay CSK, Scola RH. Muscle biopsy in Pompe disease. *Arq Neuropsiquiatr*. 2013;71(5):284-289. doi:10.1590/0004-282X20130022
33. Niño MY, Wijgerde M, de Faria DOS, et al. Enzymatic diagnosis of Pompe disease: lessons from 28 years of experience. *European Journal of Human Genetics*. 2021;29(3):434-446. doi:10.1038/s41431-020-00752-2
34. Savarese M, Torella A, Musumeci O, et al. *Targeted Gene Panel Screening Is an Effective Tool to Identify Undiagnosed Late Onset Pompe Disease*.
35. Stevens D, Milani-Nejad S, Mozaffar T. Pompe Disease: a Clinical, Diagnostic, and Therapeutic Overview. *Curr Treat Options Neurol*. 2022;24(11):573-588. doi:10.1007/s11940-022-00736-1

36. Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genetics in Medicine*. 2006;8(5):267-288. doi:10.1097/01.gim.0000218152.87434.f3
37. Borie-Guichot M, Tran ML, Génisson Y, Ballereau S, Dehoux C. Pharmacological chaperone therapy for pompe disease. *Molecules*. 2021;26(23). doi:10.3390/molecules26237223
38. Zhu Y, Jiang JL, Gumlaw NK, et al. Glycoengineered acid α -glucosidase with improved efficacy at correcting the metabolic aberrations and motor function deficits in a mouse model of pompe disease. *Molecular Therapy*. 2009;17(6):954-963. doi:10.1038/mt.2009.37
39. Dhillon S. Avalglucosidase alfa: First Approval. *Drugs*. 2021;81(15):1803-1809. doi:10.1007/s40265-021-01600-3
40. Valenzano KJ, Khanna R, Powe AC, et al. Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. *Assay Drug Dev Technol*. 2011;9(3):213-235. doi:10.1089/adt.2011.0370
41. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
42. Tobias B, Haack. ELAC2 Mutations Cause a Mitochondrial RNA Processing Defect Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*. Published online 2013.
43. Zarghuna M A Shinwari. The Phenotype and Outcome of Infantile Cardiomyopathy Caused by a Homozygous ELAC2 Mutation. *Cardiology*. Published online 2017.
44. Wilde AAM, Amin AS. Clinical Spectrum of SCN5A Mutations: Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Cardiomyopathy. *JACC Clin Electrophysiol*. 2018;4(5):569-579. doi:10.1016/j.jacep.2018.03.006

7.RINGRAZIAMENTI

Giunge la conclusione di questo mio percorso. Lungo e difficoltoso, ma anche estremamente bello e soddisfacente. Ho molte persone che desidero ringraziare, tante che mi hanno sostenuto durante questo viaggio, ed altre, che anche solo con un incoraggiamento mi hanno aiutato ad arrivare fin qui.

Ringrazio, innanzitutto, tutto il personale della SCDU di Anatomia Patologica di Novara per l'aiuto datomi nella stesura di questa tesi e per la continua disponibilità. Ringrazio, inoltre, la professoressa Mara Giordano, la dottoressa Simona Bellone e tutti i collaboratori dei laboratori di Genetica, per la tempestività e l'efficienza con cui hanno svolto le indagini necessarie per questo lavoro. Ringrazio anche il dottor Matteo Castagno, della SCDU di Pediatria di Novara, per l'aiuto costante nella raccolta dei dati.

Un sentito ringraziamento al mio relatore, il professor Renzo Boldorini, il quale fin da subito ha accettato e sostenuto la mia richiesta di poter lavorare su un argomento che riguardasse l'ambito pediatrico, affidandomi questo caso. Ci tengo anche a ringraziarlo per la costante disponibilità e l'importante aiuto, sia in termini umani che medici, che ho ricevuto da lui in questi ultimi mesi di collaborazione.

Un immenso grazie alla mia famiglia e, soprattutto, ai miei genitori, Paolo e Laura, che mi hanno permesso di poter intraprendere questo cammino, per il quale spero di averli resi e renderli, anche in futuro, orgogliosi di me. Grazie per essere stati presenti sia nei momenti più gioiosi sia, soprattutto in quelli più bui, credendo sempre in me dal primo momento.

Infine, voglio ringraziare tutte quelle persone che, con un consiglio, una bella parola, un aiuto o una risata mi hanno dato la forza di arrivare fino a qui.

Dai miei amici da una vita, qui a Villata, a tutti quelli che sono venuti dopo. Siete veramente tantissimi e a tutti voi va un immenso grazie.

E per ultimi, ma non per importanza, ringrazio tutte le persone conosciute in questi sei lunghi anni, dai miei colleghi e amici di Alessandria a tutti quelli conosciuti a Novara, con i quali, abbiamo condiviso le gioie e le sofferenze che questo percorso ci ha offerto.

