



COMUNICAZIONI ORALI

O-001

Regulation of BMP signaling by *N*-glycanase 1 (*NGLY1*)

Galeone G^{1,2}, Adams A¹, Zuberi Z³, Jafar-Nejad J¹

¹Baylor College of Medicine, Houston, United States, ²Universita' degli Studi di Milano, Milano, Italy, ³The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, United States

INTRODUZIONE/BACKGROUND: *NGLY1* (*N*-glycanase 1) encodes an evolutionarily conserved enzyme that catalyzes the cleavage of *N*-glycans from glycoproteins. Mutations in human *NGLY1* cause a congenital disorder of glycosylation (CDG) with severe developmental delay, complex hyperkinetic movement disorder, delayed bone age and osteopenia, gastrointestinal dysfunction, small hands/feet, and absent tears. However, the mechanism by which *NGLY1* deficiency causes the above-mentioned clinical phenotypes is not known, and neither has *NGLY1* been linked to any major developmental signaling pathway.

METODI / PAZIENTI: We have developed a cross-species analysis of human *NGLY1* in *Drosophila melanogaster*, cell culture, and mouse models. Genetic and biochemical experiments have been performed in *NGLY1* null alleles and in patient-derived alleles.

RISULTATI: We found that the *Drosophila* homolog of *NGLY1* (*PNGase-like; Pngl*) regulates bone morphogenetic protein (BMP) signaling in the embryonic visceral mesoderm (VM). Specifically, the enzymatic activity of Pngl is required for an autoregulatory loop mediated by the *Drosophila* BMP2/4 homolog Decapentaplegic (Dpp). We used biochemical and *in vivo* structure-function analyses to show that the Dpp protein itself is a biologically-relevant target of Pngl. Moreover, *in vivo*, cell culture and biochemical experiments indicate that mouse *NGLY1* is also required for BMP signaling in some contexts, by promoting the retrotranslocation of misfolded BMP4 protein from the endoplasmic reticulum (ER).

DISCUSSIONE: Our data establish cytoplasmic deglycosylation of BMP ligands as a novel, evolutionarily conserved mechanism for the regulation of BMP signaling. Together, these results may provide a framework for understanding some aspects of patients' clinical features with *NGLY1* deficiency.

Analisi OMICA del modello animale di Mucopolisaccaridosi di tipo IIIB

Caterino M^{1,3}, Costanzo M^{1,3}, De Pasquale V¹, Pavone L M¹, Siciliano R A², Mazzeo M F², Ruoppolo M^{1,3}
¹Dip Med Mol e Biot Med Univ Federico II, Napoli, Italy, ²Ist Scienze Alimentazione CNR, Avellino, Italy,
³CEINGE scarl, Napoli, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND. La Mucopolisaccaridosi (MPS) di tipo IIIB è un disordine lisosomiale dovuto alla carente attività enzimatica della α -N-acetilglucosamminidase (NAGLU), che catalizza la degradazione dei glicani costituiti da eparan solfato (HS). Il difetto enzimatico determina l'accumulo di HS in fegato, rene, milza, cuore e nel sistema nervoso centrale con conseguenti disfunzioni multiple quali epatomegalia, difetti cardiaci e degenerazione cognitiva. Il modello murino, silente per l'espressione del gene NAGLU, presenta un massivo accumulo di HS e riproduce le principali caratteristiche della patologia. Le alterazioni metabolomiche ed i profili di espressione proteica nei tessuti del modello murino interessati dall'accumulo di glicani, sono stati studiati con un approccio di tipo 'omico'.

METODI / PAZIENTI. L'espressione proteica è stata caratterizzata e quantizzata in cervello del topo modello, mediante un approccio di proteomica differenziale *shotgun label free mass spectrometry*. Le acilcarnitine e gli amminoacidi sono stati dosati in fegato e cuore del modello murino.

RISULTATI . I profili di espressione proteica differenziale rivelano la deregolazione di circa 70 proteine. L'analisi bioinformatica evidenzia la regolazione di un gruppo significativo di proteine coinvolte nell'organizzazione del citoscheletro. Risultano inoltre deregolate proteine coinvolte nel mantenimento della plasticità sinaptica. L'analisi metabolomica evidenzia un aumento delle concentrazioni delle acilcarnitine a catena corta e media e dei livelli degli amminoacidi ramificati ed aromatici.

DISCUSSIONE. L'analisi omica condotta ad ampio raggio su tessuti del modello murino per la MPS IIIB consente di evidenziare alterazioni metaboliche e proteiche riconducibili ad alterazioni a carico del metabolismo lipidico, attivazione del meccanismo di insulino-resistenza ed ipertrofia cellulare.

Effetto metabolico precoce del trapianto di fegato in leucinosi, argininosuccinico aciduria e acidemia metilmalonica

Porta F¹, Romagnoli R², Busso M¹, Tandoi F², Spada M¹

¹SC Pediatria, Malattie metaboliche, Torino, Italy, ²Centro trapianti di fegato, Chirurgia 2U, Torino, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Il trapianto di fegato (TF) può essere indicato in diverse malattie metaboliche (MME), consentendo il ripristino della funzione epatica quando compromessa, la guarigione delle MME a espressione esclusivamente epatica del difetto o una parziale correzione metabolica nelle MME con espressione sistemica del difetto. Quest'ultima indicazione può applicarsi a leucinosi (MSUD), argininosuccinico aciduria (ASA) e acidemia metilmalonica (MMA). Nella MSUD, il TF consente la normalizzazione della dieta e previene il rischio di scompenso metabolico. Benefici simili sono ottenuti nell'MMA (accanto a miglioramento della prognosi nefrologica). Le rare esperienze di TF nell'ASA sono altresì positive. L'effetto metabolico immediato del TF, tuttavia, è poco noto.

METODI / PAZIENTI: Questo aspetto è stato valutato in 5 pazienti (2 con MSUD, 1 con ASA e 2 con MMA) sottoposti a TF a 21.4 ± 10.6 mesi di vita. L'effetto metabolico immediato del TF nelle diverse condizioni è stato valutato analizzando il profilo metabolico periferico prima e dopo la riperfusionazione portale. Nessun paziente è stato sottoposto a dialisi pre-trapianto.

RISULTATI: In MMA e ASA, il TF ha consentito la riduzione del 90% dei rispettivi metaboliti tossici (MMA e ASA) nella prima ora dopo la riperfusionazione portale. Nella MSUD, la concentrazione dell'alloisoleucina 12 ore dopo il TF è risultata ancora 15-20 volte superiore a quella rilevata nel post-trapianto a lungo termine. Parallelamente, il TF ha consentito la normalizzazione della leucina entro 12 ore.

DISCUSSIONE: Il TF in MMA, ASA e MSUD garantisce vantaggi clinici e metabolici immediati, con prevenzione del rischio di scompenso metabolico anche nel caso di complicanze post-chirurgiche. La valutazione dell'effetto metabolico precoce del TF in MSUD, MMA e ASA rappresenta un metro di paragone essenziale per la valutazione dell'efficacia di nuove strategie terapeutiche per queste malattie metaboliche.

DNAJC12: valutazione metabolica dinamica comparata delle iperfenilalaninemie ereditarie

Porta F¹, Ponzone A¹, Pagliardini V¹, Pieretti S¹, Busso M¹, Giorda S¹, Spada M¹

¹SC Pediatria, Malattie metaboliche, Torino, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Le iperfenilalaninemie primitive sono storicamente distinte in difetti di fenilalanina idrossilasi (PAH) e difetti di tetraidrobiopterina (BH4), suo cofattore naturale. Recentemente, il difetto del gene DNAJC12 è stato identificato come nuova causa di iperfenilalaninemia ereditaria associata a difetto neurotrasmettitoriale (difetto combinato di fenilalanina, tirosina e triptofano idrossilasi). La fisiopatologia del difetto di DNAJC12 è al momento ignota. Parallelamente, non esistono dati quantitativi che consentano di inquadrare dal punto di vista metabolico il difetto di DNAJC12 nell'ambito delle iperfenilalaninemie ereditarie.

METODI / PAZIENTI: In questo lavoro, abbiamo comparato la risposta biochimica differenziale di pazienti affetti da diverse forme di iperfenilalaninemia ereditaria (difetto di PAH, difetti di BH4 e difetto di DNAJC12) a un carico semplice con fenilalanina (100 mg/kg) e a uno combinato con fenilalanina (100 mg/kg) e BH4 (20 mg/kg).

RISULTATI: Nel difetto di DNAJC12, il carico semplice con fenilalanina ha determinato una risposta biochimica sovrapponibile a quella osservata nell'iperfenilalaninemia benigna, con picco di fenilalanina osservato 3 ore dopo il carico e suo progressivo decremento fino alle condizioni basali osservato dopo 24 ore. Il profilo metabolico dopo carico combinato con fenilalanina e BH4 è risultato sovrapponibile. Nei difetti di PAH severo e mild, il decremento della fenilalanina ematica 24 ore dopo il carico è risultato inferiore (~30% e 50%, rispettivamente) e non alterato dalla somministrazione di BH4. Al contrario, nei difetti di BH4 la somministrazione del cofattore ha determinato sostanziale incremento dell'idrossilazione periferica della fenilalanina e sua precoce normalizzazione.

DISCUSSIONE: A differenza di quanto osservato nei difetti di BH4, il carico combinato con fenilalanina e BH4 nel difetto di DNACJ12 non ne consente la differenziazione dal difetto di fenilalanina idrossilasi.

Il profilo lipidomico della malattia di Niemann Pick tipo C

Catesini G¹, Deodato F¹, Taurisano R¹, Dionisi Vici C¹, Boenzi S¹

¹U.O. Pat. Met., Osp. Ped. Bambino Gesù, Roma, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: La malattia di Niemann-Pick Tipo C (NPC) è una malattia lisosomiale causata da mutazioni a carico dei geni NPC1 e NPC2 responsabili di accumulo intracellulare di colesterolo libero e altri derivati lipidici. Nell'ambito delle scienze omiche, la lipidomica si prefigge la caratterizzazione delle specie lipidiche nelle matrici biologiche. Lo studio del lipidoma nel campo delle malattie metaboliche è in via di espansione.

METODI / PAZIENTI: Abbiamo effettuato uno studio di lipidomica wide-targeted (Lipidyzer™) che permette l'analisi di oltre 1100 molecole lipidiche appartenenti a 13 classi differenti. Sono stati studiati i campioni di plasma ottenuti da 15 pazienti NPC1, da 14 soggetti eterozigoti e confrontati con 15 controlli di età correlata. La concentrazione dei lipidi bersaglio è stata quantificata mediante cromatografia liquida abbinata a spettrometria di mobilità ionica (LC-IMS/MS). L'analisi statistica dei profili lipidici è stata effettuata mediante metodiche supervised (volcano plot, PLSDA, heatmap) e unsupervised (PCA).

RISULTATI: L'analisi del lipidoma ha permesso una significativa differenziazione dei pazienti NPC rispetto ai controlli e, in misura minore, rispetto agli eterozigoti che presentano un profilo intermedio. Secondo il parametro VIP-score i lipidi che maggiormente distinguono i pazienti rispetto ai controlli sono i colesterilesteri e i di/tri-gliceroli con catene >20 atomi di carbonio. La concentrazione di alcune specifiche sfingomieline risulta invece diminuita nei pazienti rispetto ai controlli.

DISCUSSIONE: Lo studio mostra come l'analisi lipidomica wide-targeted abbia permesso l'identificazione di nuovi candidati biomarcatori e ha fornito nuove informazioni utili per lo studio dei meccanismi fisiopatologici della malattia di NPC, tuttora non del tutto chiariti.

Diagnosi precoce di alfa-mannosidosi: trattamento con velmanase alfa ed effetto sugli oligosaccaridi

Santoro L¹, Zampini L², Galeazzi T², Padella L², Marchesiello R², Monachesi C², Cordiali R¹, Gabrielli O¹, Catassi C¹

¹CI Ped, UNIVPM, PO Salesi, Ancona, Italy, ²Lab Mal Metab, UNIVPM, PO Salesi, Ancona, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: L'alfa-mannosidosi è una malattia da accumulo lisosomiale ultra-rara, caratterizzata dalla degenerazione progressiva di diversi organi ed apparati con decorso variabile. Per le forme gravi la terapia elettiva è rappresentata dal trapianto di midollo osseo/cellule staminali. Solo di recente è stata approvata la terapia enzimatica sostitutiva (ERT) con Velmanase alfa, per il trattamento delle manifestazioni non neurologiche nelle forme lievi e moderate.

METODI / PAZIENTI: Nel nostro caso viene posto il sospetto di malattia lisosomiale a 5 mesi di vita per presenza di gibbo, e diagnosi di alfa-mannosidosi a 6 mesi. Approfondita valutazione clinica e strumentale è stata eseguita alla diagnosi e dopo 6 settimane di ERT. Nello stesso periodo sono stati raccolti campioni di siero ed urine prima e dopo infusione con Velmanase alfa e determinato il profilo degli oligosaccaridi tramite LC-MS/MS.

RISULTATI: Alla diagnosi riscontro di epatomegalia, insufficienza valvolare aortica lieve, segni di disostosi multipla e idrocele bilaterale con principio di ernia inguinale destra, in assenza di ritardo psicomotorio. Dopo 6 settimane di ERT esame neurologico adeguato per età e riduzione dell'epatomegalia. L'analisi semiquantitativa di 3 oligosaccaridi ricchi in mannosio evidenziava una diminuzione di circa il 60% sia nel siero che nelle urine.

DISCUSSIONE: Per la prima volta viene descritto un caso di alfa mannosidosi ad esordio precoce sottoposto ad ERT in epoca pre-trapianto ad appena sei mesi di vita. Il follow up clinico e le analisi biochimiche riferite alle prime sei settimane di trattamento prima del trapianto mostrano una notevole diminuzione dei livelli di oligosaccaridi sierici ed urinari, riduzione della visceromegalia e stabilità degli altri parametri clinici. Questi primi dati evidenziano l'effetto favorevole dell'ERT somministrata precocemente. In epoche successive sarà possibile la valutazione dell'efficacia dell'ERT combinata al trapianto.

Difetti della β -ossidazione:dallo screening neonatale alla caratterizzazione clinica e genetica. Esperienza di un Centro

Maguolo A¹, Rodella G^{2,3}, Bordugo A^{1,3,4}, Tonin P⁸, Dianin A^{1,3}, Gugelmo G⁷, Rigotti E¹, Monge I³, Salviati L^{5,6}, Pasini A⁴, Campostrini N⁴, Ionpopa F⁴, Teofoli F^{2,4}, Vincenzi M⁴, Camilot M^{2,4}

¹U.O.C. Pediatria, Osp Donna e Bambino, Verona, Italy, ²Pediatria, Dip Sci Chir Odonto Mat-Inf, Verona, Italy, ³U.O.S Mal Metaboliche Ereditarie, Ped, Verona, Italy, ⁴Centro Regionale screening neonatali, Verona, Italy, ⁵Genetica Clin, Dip Donna e Bambino, Padova, Italy, ⁶IRP, Citta della Speranza, Padova, Italy, ⁷Az Assistenza Sanitaria n.5 FVG, Osp, San Vito al Tagliamento, Italy, ⁸U.O.C Neurologia, Dip Neurosci Biomed Mov, Verona, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: I difetti della β ossidazione degli acidi grassi (FAODs) comportano una alterazione di trasporto degli acidi grassi e della loro β ossidazione nel mitocondrio. Lo screening neonatale esteso (SNE) ha permesso di individuare precocemente i FAODs con l'obiettivo di ridurre la mortalità e le complicanze.

METODI / PAZIENTI: Analisi retrospettiva delle caratteristiche biochimiche (pattern di acilcarnitine su spot e plasmatiche alla conferma/diagnosi), cliniche (sintomatologia e complicanze), genetiche ed enzimatiche di un gruppo di pazienti FAODs, diagnosticati clinicamente o mediante SNE presi in carico da Febbraio 2014 a Luglio 2018 presso il nostro Centro Regionale.

RISULTATI: 20 pazienti sono stati diagnosticati in epoca neonatale tramite SNE: 3 VLCADD, 5 MCADD, 2 MADD, 5 SCAD, 2 CUD e 3 pazienti con eterozigosi sinergica: 1 VLCADD/LCHADD e 2 MCAD/MADD. Di questi, 10 presentano 1 o 2 mutazioni non descritte in letteratura e nessuno ha sviluppato complicanze durante il periodo di osservazione. 11 pazienti sono stati invece diagnosticati per sintomi (età media alla diagnosi: 30,7 anni): 1 VLCAD, 5 MADD, 2 CPT2, 1 eterozigote sinergico per MCAD/MADD e 2 CUD. Dopo la presa in carico si è osservata una stabilizzazione clinica. 4 tra questi hanno 1 o 2 mutazioni non precedentemente descritte in letteratura.

DISCUSSIONE: I dati evidenziano che lo SNE ha inciso sulla morbilità e la prognosi di questi difetti, ha fatto emergere nuovi fenotipi (milder) e nuovi genotipi (eterozigosi sinergiche), esaltandone l'eterogeneità clinica e molecolare. Alcune delle mutazioni riscontrate non sono mai state riportate in letteratura. Interessantissima e di non facile inquadramento la presenza concomitante, in alcuni neonati, di mutazioni in eterozigosi su geni diversi e con possibili effetti sinergici, che pongono importanti problemi di comunicazione e gestione clinica. La creazione di banche dati comuni diventerà sempre di più uno strumento indispensabile.

O-008

Efficacia della dieta chetogena nell'iperinsulinismo farmaco-resistente da mutazioni *GCK*: studio su 3 pazienti

Maiorana A¹, Campana C¹, Bernabei S³, Caviglia S², Olivieri G¹, Procopio E⁴, Dionisi-Vici C¹
¹Metabolic Div, Bambino Gesù Child Hosp, Rome, Italy, ²Psychology Unit, Bambino Gesù Child Hosp, Rome, Italy, ³Clin Nutrition, Bambino Gesù Child Hosp, Rome, Italy, ⁴Metabolic Div, Meyer Child Hosp, Florence, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: L'Iperinsulinismo Congenito (IC) riconosce varie cause genetiche e si distingue istologicamente in forme diffuse e focali, queste ultime trattate elettivamente con pancreasectomia parziale. Solo se la terapia farmaco-nutrizionale è inefficace, la forma diffusa viene candidata alla pancreasectomia subtotale, con successivo rischio di diabete. Mutazioni del gene *GCK* sono responsabili di forme farmaco-resistenti con elevato rischio di danno neurologico. Stante la dimostrata efficacia della dieta chetogena (KD) per il trattamento della sintomatologia neurologica indotta dalla neuroglucopenia nel deficit di GLUT1, abbiamo valutato l'impatto della KD in casi farmaco-resistenti di *GCK-IC* con ipoglicemia refrattaria.

METODI: Abbiamo trattato con KD (ratio 2.7-4:1) 3 pz *GCK-IC* farmaco-resistenti, valutandone (pre-KD e in-KD) quadro neurologico, qualità di vita (QoL) e profilo metabolico.

RISULTATI: 2/3 pazienti che presentavano epilessia hanno mostrato scomparsa delle crisi e normalizzazione dell'EEG; 3/3 pazienti hanno mostrato miglioramento delle performances neurocognitive, adattive (QA 75.5-85 vs 80.5-97, vn 85-115) e comportamentali (CBCL int-est 51-66.5 vs 42-55, vn < 60). La QoL è significativamente migliorata in KD (28-87 vs 72-97, vn >50). La chetonemia in KD è risultata di 3.7±0.9 mM; la glicemia non ha mostrato variazioni (43±5 vs 34±5 mg/dl, p=0.10), l'insulinemia si è ridotta in 1 paziente (18,2±8,9 vs 7±6 µU/ml, p=0.05). Al follow-up, le terapie farmacologiche (diazossido, octreotide, sirolimus) sono state sospese in tutti i pazienti.

DISCUSSIONE: La KD ha determinato la scomparsa della sintomatologia autonoma e neuroglucopenica. Tutti i pazienti hanno un mostrato miglioramento delle capacità neurocognitive e della QoL. Questo studio ha dimostrato come la KD, che garantisce al SNC un substrato energetico alternativo al glucosio, è efficace in alcuni casi di IC farmaco-resistente, evitando il ricorso alla demolitiva pancreasectomia subtotale.

Funzioni esecutive ed outcome in 56 soggetti adulti fenilchetonurici trattati precocemente

Manti F¹, Romani C², Nardecchia F¹, Valentini F³, Fallarino N³, Carducci C⁴, Guariglia C³, De Leo S⁵, MacDonald A⁶, Hiwott T⁷, Palermo L⁸, Leuzzi V¹

¹Dip Neur Umane, Università Sapienza, Roma, Italy, ²Sch Life Health Sc, Aston University, Birmingham, United Kingdom, ³Dip Psicologia, Università Sapienza, Roma, Italy, ⁴Dip Med Sper, Università Sapienza, Roma, Italy, ⁵Dip Med Clin, Policlinico Umberto I, Roma, Italy, ⁶Birmingham Children's Hospital, Birmingham, United Kingdom, ⁷Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, United Kingdom, ⁸Dip Sc Med Chir, Univ Magna Graecia, Catanzaro, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: L'occorrenza di deficit delle Funzioni Esecutive nei soggetti fenilchetonurici (PKU) è stato oggetto di numerosi studi nell'arco degli ultimi 10 anni. Gli obiettivi di questo lavoro sono stati quelli di valutare l'effetto del controllo metabolico, nelle diverse fasce di età, sulle funzioni cognitive di soggetti adulti KU trattati precocemente (ETPKU) e validare un protocollo di studio, indipendentemente dal background culturale, attraverso il confronto tra soggetti PKU italiani (ITPKU) e inglesi (UKPKU).

METODI/PAZIENTI: Sono stati arruolati 56 soggetti ETPKU (26.8±6.8 anni) e 49 soggetti di controllo (TD), comparabili per età, sesso e livello socio-economico. Sono state esaminate le seguenti abilità: attenzione sostenuta (AS, tempi di reazione); coordinazione visuo-motoria (CVS), pianificazione, flessibilità cognitiva (FC), working memory, memoria a breve termine (MBT). Le performance rilevate sono state correlate con gli abituali indici metabolici stratificati per fascia di età.

RISULTATI: Dal confronto tra TD e ETPKU emergono cadute significative nelle seguenti aree: AS, CVS, FC; fluenza verbale (FV). Correlazioni significative si evidenziano tra valori di Phe storici e attuali e i punteggi ottenuti ai test. Confrontando ITPKU e UKPKU emergono cadute significative per il sottogruppo italiano in AS, mentre la FV e la MBT risultano maggiormente preservate rispetto ai soggetti UKPKU.

DISCUSSIONE: I nostri risultati confermano l'esistenza di una vulnerabilità specifica delle diverse funzioni cognitive in relazione all'età di esposizione a valori più elevati di Phe. Questo è in accordo con l'ipotesi di un modello *developmental* per la PKU trattata precocemente. Inoltre abbiamo potuto verificare la sensibilità del protocollo utilizzato in differenti background culturali. Infine abbiamo mostrato una variabilità dell'outcome clinico nell'adulto non del tutto riconducibile alla qualità del controllo metabolico suggerendo questo una sorta di vulnerabilità individuale alla Phe.

Caratterizzazione clinica del tremore in soggetti fenilchetonurici trattati precocemente

Manti F¹, Nardecchia F¹, Carducci C², Carducci C², De Leo S³, Leuzzi V¹

¹Dip Neur Umane, Universita Sapienza, Roma, Italy, ²Dip Med Sper, Universita Sapienza, Roma, Italy, ³Dip Med Clin, Policlinico Umberto I, Roma, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Il tremore è un disturbo del movimento frequentemente osservato nei pazienti con fenilchetonuria(PKU).Elevati livelli di fenilalanina(Phe) possono alterare la sintesi dei neurotrasmettitori cerebrali quali dopamina(DA) e 5-idrossitriptofano.L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare l'occorrenza, età di esordio, localizzazione del tremore nei soggetti PKU e valutare il rapporto con le variabili metaboliche della malattia.

METODI/PAZIENTI: 74 soggetti PKU[59 Early Treated PKU(ETPKU) e 15 Late Treated PKU(LTPKU), range 7-54 anni] e 43 soggetti di controllo(TD) sono stati sottoposti ad una valutazione clinica del tremore attraverso la Fahn-Tolosa-Marin Tremor Rating Scale(FTMTRS) e del QI.I punteggi ottenuti alle scale sono stati correlati con i seguenti parametri metabolici: Phe, tirosina e prolattina(PRL).

RISULTATI: Il tremore è stato rilevato in 29/74 pazienti PKU: posturale e d'azione in 18 soggetti;posturale, d'azione e a riposo in 3 PKU; posturale della lingua in 2 PKU e tremore della voce in 1 paziente PKU. Il range di punteggi alla FTMTRS era 0-27 per ETPKU,0-19 per LTPKU e 0-5 per i TD. La maggior parte dei pazienti presentava iperreflessia tendinea. Correlazioni significative si evidenziano tra valori di PRL e i punteggi alla FTMTRS.

DISCUSSIONE: Le caratteristiche cliniche del tremore nei PKU evocano quelle del tremore essenziale(TE), tuttavia, considerando l'età precoce di insorgenza, indipendentemente dalla qualità del controllo metabolico, la sua prevalenza è molto più alta rispetto al TE nella popolazione generale. È interessante notare che soprattutto nel gruppo di pazienti ETPKU è stata trovata una correlazione positiva tra il punteggio di gravità alla FTMTRS e i valori di PRL (parametro indiretto della disponibilità della DA cerebrale).Si può ipotizzare che i pazienti con PKU siano più vulnerabili al manifestarsi di un tremore e/o che elevati livelli di Phe in età precoce possano anticipare l'insorgenza del tremore.

Studio mediante ecocardiografia in modello murino di malattia di Pompe: nuovi risvolti clinici nella gestione dei pazienti late-onset.

Acampora E¹, Rubino M³, Caiazza M³, Belfiore M⁷, Iacobellis F⁷, Magaldi M³, Coletta M¹, Nusco E², Tarallo A^{1,2}, Damiano C^{1,2}, Esposito S⁶, Parenti G^{1,2}, Limongelli G^{3,4,5}

¹Dip. S. Med. Traslazionali AOU Federico II, Napoli, Italy, ²Telethon Institute Genetics and Medicine, Pozzuoli, Italy, ³Dip. S. Med. Traslazionali, L. Vanvitelli, Napoli, Italy, ⁴Osp. Monaldi, AORN Colli, Napoli, Italy, ⁵I. Cardiovascular Sciences, Univ. College, Londra, United Kingdom, ⁶UOC di Anatomia Patologica del P.O., Aversa, Italy, ⁷Dip. Med. Clin e Sperim., L. Vanvitelli, Napoli, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: La malattia di Pompe (MP) è una miopatia metabolica dovuta a mutazioni del gene GAA che determina deficit dell'enzima alfa-glucosidasi acida nei lisosomi con accumulo di glicogeno nei diversi organi e tessuti. Diverse mutazioni comportano una eterogeneità del quadro clinico da forma infantile classica (grave cardiomiopatia e compromissione muscolare ingravescente con insufficienza respiratoria) a forme giovanili/adulte (late-onset) (manifestazioni solo del sistema muscolare scheletrico). Negli ultimi anni sono state descritte alterazioni cardiovascolari anche in pazienti con forme late-onset. Nel nostro studio abbiamo utilizzato un modello murino di MP (Gaa^{-/-}) per studiare il coinvolgimento cardiovascolare a varie età

METODI/PAZIENTI: 17 topi ko Gaa^{-/-} e 17 topi WT (comparati per età, sesso e peso) sono stati sottoposti a ecocardiografia (a 8 e 20 mesi). Sacrificati a 20 mesi con valutazione anatomopatologica dei tessuti di interesse (cuore, aorta)

RISULTATI: lo studio ha mostrato un aumento dimensionale del ventricolo sinistro (dl 1.29 vs 0.84 - *p< 0.01), dilatazione dell'arco aortico (dl 1.49 vs 1.19 - *p< 0.01), dell'aorta ascendente (dl 1.56 vs 1.10 - *p< 0.01) e del primo tratto dell'aorta discendente (dl 1.18 vs 1.04 - *p< 0.01). Inoltre si è osservato a differenti età di sviluppo e sullo stesso animale incremento della dilatazione aortica nel corso dell'età (arco aortico medio 1,49 vs 1,54 – aorta ascendente 1.56 vs 1.65). Le analisi immunoistochimiche hanno mostrato accumulo di glicogeno, presenza di cellule infiammatorie e depositi di collagene a carico del tessuto cardiaco e vascolare aortico nei topi Gaa^{-/-} rispetto ai WT

DISCUSSIONE: il nostro studio ha confermato lo sviluppo di ipertrofia miocardica, già precedentemente descritta, ed osservato un coinvolgimento vascolare con sviluppo progressivo di dilatazione aortica nel tempo. Sulla base di questi dati si ritiene opportuna una valutazione cardiovascolare appropriata in pazienti late-onset

Nuova metodica per il dosaggio dei glicosamminoglicani mediante HPLC-MS/MS per la diagnosi delle Mucopolisaccaridosi (MPS).

Polo G¹, Colucci F¹, Rubert L¹, Pascarella A¹, Cazzorla C¹, Gueraldi D¹, Burlina A¹

¹Div Inher Metab Dis, Univ Hosp, Padova, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Le nuove prospettive terapeutiche per il trattamento delle MPS rendono necessaria una diagnosi rapida ed accurata nel sospetto clinico di malattia. I metodi utilizzati finora richiedono due differenti approcci: il dosaggio quantitativo dei glicosamminoglicani (GAGs) totali e l'analisi qualitativa con elettroforesi bidimensionale. Scopo della ricerca è stato mettere a punto un unico metodo HPLC-MS/MS per il dosaggio quantitativo e qualitativo dei GAG urinari: dermatan(DS), eparan(HS) e condroitin solfato(CS) da applicare nello screening selettivo e nella conferma diagnostica dello screening neonatale.

METODI / PAZIENTI: Sono stati studiati campioni di urine di controlli sani (n=200), pazienti con MPS (n=15) e neonati con screening positivo per MPS I (n=20). Per questi ultimi sono stati analizzati i GAGs su spot di sangue (DBS) e confrontati con un gruppo controllo. I GAGs sono digeriti in disaccaridi mediante metanolisi, separati in colonna cromatografica a fase normale e analizzati in spettrometria di massa tandem.

RISULTATI: I campioni controllo sono stati utilizzati per definire i valori di riferimento dei GAGs per fascia d'età. I campioni dei pazienti affetti sono stati identificati come alterati e inquadrati nelle diverse forme di MPS in base al pattern d'accumulo: MPS I(n=3), II(n=4) e VII(n=2) elevato DS, CS e HS, MPS III(n=4) elevato HS, MPS IV(n=2) elevato CS e MPS VI (n=2) elevato DS. Il metodo applicato ai campioni di urine di neonati con screening positivo per MPS I discrimina i neonati affetti (n=2, aumentato DS e HS), dalle pseudodeficienze (n=18) con profilo GAGs normale, lo stesso vale per i DBS.

DISCUSSIONE: Il metodo permette una rapida identificazione dei pazienti affetti anche con indicazione del tipo di MPS, ed è utile nel second-tier e nella conferma dello screening neonatale per MPS I. Il Keratansolfato non può essere dosato con metanolisi limitandone l'uso nella diagnosi di MPS IV (forme lievi).

I difetti secondari di vitamina B12 diagnosticati con screening neonatale: il ruolo della dieta in gravidanza.

Fasan I¹, Rossi A¹, Rubert L¹, Pascarella A¹, Polo G¹, Zacchettin A¹, Cazzorla C¹, Massa P¹, Guerardi D¹, Burlina A¹

¹UOC Malattie Metaboliche Ereditarie, Padova, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Il deficit di vitamina B12 è frequente nella popolazione generale e nelle donne in gravidanza si assesta globalmente al 25% (Sukman 2016), con cause molteplici tra cui: deficit di assorbimento gastro-intestinale, carenze dietetiche, farmaci, chirurgia bariatrica, patologie genetiche rare. Lo Screening Neonatale Esteso permette di identificare aumenti dell'acido metilmalonico che possono essere dovuti a deficit secondari di B12. Al fine di ottenere valori normali di metilmalonico vengono proposti fabbisogni di vitamina B12 aumentati in gravidanza (EFSA 2015 4.5 mcg/die vs Larn 2014 2.6 mcg/die).

METODI: Il nostro studio indaga l'incidenza dei deficit di vitamina B12 secondari a carenza materna e la dieta in gravidanza nel periodo gennaio2014/settembre2018. Sono stati eseguiti 143529 DBS di neonati screenati. Per i valori di C3 > ai cutoff e second tier positivo si dosava omocisteina, acido metilmalonico e vitamina B12, e nei casi di difetti secondari diagnosticati si indagava la dieta e l'origine della carenza materna.

RISULTATI: I casi di deficit di B12 secondari a carenza materna sono stati 13. Valori di B12 materni: range 78-392 ng/L, mediana 155 ng/L (v.n: 206-678 ng/L), valori nel range di riferimento nel 38% dei casi. Dieta materna: 12/13 onnivora, 1/13 latte-ovo-vegetariana. Apporto di B12 materno: range 2.0-4.7 mcg/die; mediana 2.4 mcg/die. Supplementi in gravidanza: integratore di B12 0/13, multivitaminico 2/13. Cause della carenza identificate: dieta carente in B12 (< 4.5mcg) 5/6, gastrite atrofica 2/13, iperemesi gravidica 2/13, carenza di B12 pre-gravidica 1/13.

DISCUSSIONE: L'identificazione di deficit di B12 secondari in figli di madri con valori circolanti e apporti dietetici apparentemente normali deve portare ad una rivalutazione degli apporti nutrizionali e dei livelli di vitamina B12 durante la gravidanza al fine di assicurare apporti sufficienti ed evitare conseguenze dovute ad intossicazione da acido metilmalonico.

Screening neonatale esteso: non sempre la diagnosi arriva in tempo

Pasquini E¹, Daniotti M¹, Tubili F¹, Procopio E¹, Sacchini M¹, Scaturro G¹, La Spina L¹, Funghini S², Malvagia S², Caciotti A³, Cavicchi C³, Morrone A³, la Marca G², Donati M¹

¹Mal Met e Musc Ered, AOU Meyer, Firenze, Italy, ²Lab Scr Neon, Biochim Clin e Farm, AOU Meyer, Firenze, Italy, ³Lab Biol Molec e Cell, AOU Meyer, Firenze, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: lo screening neonatale esteso (SNE) mediante LC-MS/MS su spot (dried blood spot, DBS) a 48-72 ore di vita consente di identificare in fase possibilmente presintomatica circa 40 errori congeniti del metabolismo (ECM). Su un unico DBS vengono analizzati più metaboliti contemporaneamente consentendo una diagnosi precoce, di solito a 4-7 giorni di vita, di patologie a basso e alto rischio di scompenso, tra queste ultime organico acidurie (OA), difetti del ciclo dell'urea (UCD), difetti della beta-ossidazione (FAOD).

METODI/PAZIENTI: dal 2002 sono stati sottoposti a SNE oltre 500.000 nati in Toscana e dal 2010 in Umbria, con un'incidenza di ECM pari a circa 1:1500 nati.

RISULTATI: identificati 330 neonati con ECM: 56 OA, 16 UCD e 63 FAOD per un totale di 135 neonati di cui 114 asintomatici al momento della diagnosi. Dei 21 neonati già sintomatici prima dell'esito dello SNE (acidosi metabolica, ipoglicemia, iperammoniemia), 1 è deceduto a 51 ore di vita per Sudden Unexpected Death in Infants (SUDI) prima dell'arrivo del DBS al centro screening su cui è stata poi eseguita diagnosi post mortem di FAOD (LCHAD). Dei restanti 20, 12 erano OA (5 metilmalonico aciduria Mut0, 1 Cbl B, 3 isovalerico aciduria, 2 propionico aciduria, 1 glutarico aciduria), 3 UCD (1 arginisuccinico aciduria, 2 citrullinemia I) e 5 FAOD (4 VLCAD, 1 MCAD). 3/20 pazienti sono deceduti (1 MMA Mut0, 1 IVA, 1 VLCAD) successivamente alla diagnosi, in 6° e 8° giornata e a 4 mesi di vita.

DISCUSSIONE: la nostra esperienza dimostra che, in difetti ad alto rischio di scompenso, l'esordio può essere molto precoce, talora entro 48-72 ore di vita, e che la diagnosi non sempre giunge in tempi adeguati per consentire una terapia efficace e un buon outcome. Si sottolinea l'importanza dell'organizzazione del sistema screening per garantire una diagnosi entro 4-5 giorni di vita: prelievo a 48 ore, invio rapido al centro di riferimento, attività di laboratorio e clinica 7 giorni su 7.

Nuovi biomarcatori e biopsia liquida per la malattia di Pompe

Tarallo A^{1,2}, Carissimo A³, Damiano C¹, Mongini T⁵, Santoro L⁶, Deodato F⁷, Bembi B⁸, Dardis A⁸, Musumeci O⁴, Toscano A⁴, Amoresano A¹⁰, Ruoppolo M⁹, Pijnappel P¹¹, Van der Ploeg A¹¹, Parenti G^{1,2}
¹Dip Sc Med Transl, AOU FedericoII, Napoli, Italy, ²Telethon Institute Genetics and Medicine, Pozzuoli, Italy, ³Ist Applicaz Calcolo - Mauro Picone, Napoli, Italy, ⁴Dip Neuroscienze, Univ Messina, Messina, Italy, ⁵Dip Neuroscienze, Univ Torino, Torino, Italy, ⁶Dip Neuroscienze, AOU FedericoII, Napoli, Italy, ⁷Osp Ped Bambin Gesu, Rome, Italy, ⁸AOU-Santa Maria della Misericordia, Udine, Italy, ⁹Dip Sc Chimiche, AOU Federico II, Napoli, Italy, ¹⁰Dip MedMol BiotecMed, AOU Federico II, Napoli, Italy, ¹¹Metab Dis Center, Erasmus MC University, Rotterdam, Netherlands

INTRODUZIONE/BACKGROUND: La valutazione delle condizioni del paziente e il monitoraggio dell'efficacia della Terapia Enzimatica Sostitutiva (ERT), sono aspetti critici nella gestione della malattia di Pompe (MP), una miopatia metabolica ereditaria dovuta al deficit dell'enzima lisosomiale alfa glucosidasi acida (GAA). Biomarcatori ideali dovrebbero essere specifici, quantitativi e misurabili in campioni ottenibili mediante procedure non invasive. In questo studio stiamo mettendo a punto un insieme di biomarcatori misurabili nel plasma di pazienti MP, basato sull'analisi di micro-RNA (miRNA) e ossilipine. I miRNA sono piccoli RNA non codificanti che regolano l'espressione genica. Le ossilipine sono un gruppo emergente di metaboliti, generato dall'ossigenazione di acidi grassi polinsaturi. Entrambi sono molecole coinvolte in molteplici funzioni biologiche e il loro contenuto in circolo può alterarsi in risposta a stati patologici.

METODI/PAZIENTI: Stiamo valutando miRNA circolanti e ossilipine sieriche in campioni di 52 pazienti e nel modello murino. Il nostro approccio combina tecniche di Next Generation Sequencing, spettrometria di massa tandem e analisi bioinformatica.

RISULTATI: In un precedente lavoro abbiamo dimostrato che miR-133a è upregolato nel plasma di pazienti MP (Tarallo et al, 2018). Abbiamo esteso l'analisi ad altri due miRNA circolanti, miR-1 e miR-206. Entrambi risultano upregolati nel plasma dei pazienti MP e correlano con la gravità del fenotipo e la risposta alla ERT. Dati preliminari, inoltre, mostrano che il profilo delle ossilipine sieriche in topi MP di 3 mesi sia alterato, rispetto al profilo di topi controllo della stessa età.

DISCUSSIONE: L'identificazione di nuove classi di biomarcatori misurabili nel sangue consentirebbe l'applicabilità della cosiddetta "biopsia liquida" nella gestione della MP e l'utilizzo di nuovi strumenti affidabili per supportare la diagnosi, monitorare le condizioni del paziente e valutare l'efficacia delle terapie.

Gestione perioperatoria del trapianto di fegato in 17 pazienti affetti da Acidemia Organica, Disturbo del ciclo dell'urea e Leucinosi.

Bellusci M¹, Chiusolo R², Maiorana A¹, Pariante R², Cotugno G¹, Basso M³, Saffioti M⁴, Liguori A¹, Bernabei S¹, Bianchi R², Spada M⁴, Dionisi-Vici C¹

¹U.O. Patologia Metabolica, OPBG, Roma, Italy, ²U.O. Terapia Intensiva Pediatrica, OPBG, Roma, Italy,

³U.O. Epatologia e Gastroenterologia, OPBG, Roma, Italy, ⁴Chirurgia epato-bilio-pancreatica, OPBG, Roma, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Analisi della gestione perioperatoria (metabolica e anestesiológica) in pazienti con acidemia organica (OA), disturbi del ciclo dell'urea (UCD) e Leucinosi (MSUD) sottoposti a trapianto di fegato (LTx).

METODI / PAZIENTI: Sono state esaminate le cartelle cliniche e anestesiológicas dei pazienti con OA, UCD e MSUD sottoposti a LTx. È stato applicato un protocollo specifico per ciascuna malattia. Abbiamo registrato in fase pre-operatoria: gestione del digiuno e caratteristiche cliniche, demografiche, terapeutiche; in fase operatoria: uso di anestetici, farmaci vasoattivi, fluidoterapia, esami di laboratorio e parametri vitali; nella fase postoperatoria: tempo di estubazione, complicanze e gestione nutrizionale.

RISULTATI: 17 pazienti (6 OA, 6 UCD, 5 MSDU) sono stati trapiantati (4/17 da donatore vivente) negli anni 2011-2017. Al trapianto, tutti i pazienti erano in stato di compenso metabolico. La sopravvivenza dei pazienti e degli organi al follow-up (media $37,7 \pm 25,0$ mesi, range 11-85) è del 100%. L'età media al LTx era di $75,2 \pm 62,7$ mesi (range 24-215) e il peso medio $20,7 \pm 12,5$ Kg (range 10,5-49,5). Nella fase di preparazione il tempo medio di digiuno fu di 6 ore durante il quale si è infuso glucosio a 8-10 mg/kg/min per evitare il catabolismo. Durante le fasi anepatiche e di riperfusione d'organo, un numero significativo di pazienti ha presentato alterazioni emodinamiche con iperlattacidemia, necessitando inotropi ($p < 0,05$). La normoglicemia e il pH sono stati mantenuti con infusione di glucosio a 8-10 mg/kg/min e bicarbonato $0,54 \pm 0,39$ mEq/kg/h (range 1,5 – 0,1). Nel periodo post-operatorio, le proteine ??sono state reintrodotte progressivamente, raggiungendo la RDA in tutti i pazienti.

DISCUSSIONE: La gestione perioperatoria del LTx in pazienti con UCD, MSUD e AO è stata soddisfacente con l'uso di protocolli specifici. Le fasi chirurgiche anepatiche e di riperfusione sono state caratterizzate da transitori cambi emodinamici.

L'apporto della next generation sequencing nella diagnosi di malattie rare ad elevata eterogeneità fenotipica.

Tolve M¹, Caputi C², Manti F², Nardecchia F², Artiola C¹, Galosi G², Giovanniello T¹, D'Amici S¹, Carducci C¹, Angeloni A¹, Leuzzi V²

¹Dip. Med. Sper. La Sapienza, Roma, Italy, ²Dip. Sci. Um. La Sapienza, Roma, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Le tecniche di NGS hanno svelato le basi molecolari di varie condizioni genetiche. Un grande supporto è stato fornito dal Clinical Exome Sequencing (CES) utile per condizioni genetiche rare con eterogeneità allelica o fenotipica. Riportiamo il caso di due pazienti con fenotipi clinici eterogenei riconducibili a difetti molecolari a carico dello stesso gene.

METODI: I pazienti prima sono stati sottoposti ad un esteso screening di diagnostica molecolare con esito negativo successivamente sono stati sottoposti a sequenziamento dell'esoma clinico. La chiamata delle varianti, le analisi di filtraggio e prioritizzazione sono state eseguite utilizzando: Variant Analysis, Variant Interpreter, Phenomizer, Exomiser e PhenIX. L'analisi bioinformatica è stata effettuata mediante PredictSNP, Polyphen, SIFT e Mutation Taster.

RISULTATI: I fenotipi clinici che hanno guidato la prioritizzazione delle varianti sono stati: Caso 1: microcefalia, dimorfismi, ritardo mentale lieve, epilessia infantile, atrofia corticale e cerebellare, polineuropatia sensitivo-motoria assono-mielinica progressiva e ascendente, iperlipidemia. Caso 2: corea ad esordio precoce con evoluzione verso una polineuropatia sensitivo-motoria assono-mielinica a carattere ascendente, microcefalia, sviluppo cognitivo nella norma, atrofia cerebellare, dislipidemia e ipoalbuminemia. L'attenzione è stata posta sul gene PNKP per il quale entrambi i pazienti sono risultati eterozigoti composti, confermata mediante analisi di segregazione.

Il gene PNKP è associato sia a microcefalia, epilessia e ritardo dello sviluppo che ad atassia-aprassia oculomotoria 4, entrambe autosomiche recessive.

DISCUSSIONE: Il CES può essere utilizzato per diagnosticare fenotipi neurologici eterogenei negativi alle indagini molecolari di routine. L'applicazione di questo metodo è stata fondamentale per una diagnosi genetica a pazienti per i quali i metodi classici di analisi molecolare hanno dato risultati negativi.

Conflict of Interest declared.

Terapia dei difetti congeniti di cobalamina con somministrazione sottocutanea di vitamina B12 e catering a permanenza.

Rodella G^{1,3}, Dianin A^{2,3}, Gugelmo G⁶, Gugelmo G⁶, Monge I^{2,3}, Rigotti E², Cantalupo G⁷, Molinaro G⁵, Pellegrini F⁵, Lupi F⁵, Pasini A⁴, Campostrini N⁴, Ionpopa F⁴, Vincenzi M⁴, Teofoli F^{1,4}, Camilot M^{1,4}, Bordugo A^{2,3}

¹Dip.Sc.Mat.Inf.Univ. Verona, Verona, Italy, ²UOC Ped Osp Donna Bambino AOUI Verona, Verona, Italy, ³UOS Mal Metab Ered. UOC Ped. AOUI Verona, Verona, Italy, ⁴Centro Reg Screening Neonat. AOUI Verona, Verona, Italy, ⁵Ter Int. Neonat. Az San. Alto Adige, Bolzano, Italy, ⁶Az. San. 5 FVG Osp. S.Vito Tagliamento, San Vito Tagliamento, Italy, ⁷UOC Neuro Psic Inf. AOUI Verona, Verona, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Nei difetti congeniti della cobalamina(Cbl) è suggerita l'idrossicobalamina(OH-Cbl) per via paraterale. Le linee guida indicano la via intramuscolare(i.m) e sottocutanea(s.c.), ma, i più, usano la via i.m. Descriviamo la nostra esperienza con catetere sottocutaneo “in situ”, sostituito ogni 7 giorni, in 4 pazienti affetti da difetti congeniti della cobalamina.

PAZIENTI: F., diagnosi di Cobalamina A (CblA) con screening neonatale. Second tier con acido metilmalonico(MMA) di 200 uMol/L(vn < 5). Mutazione in omozigosi. Inizialmente 1 mg di OH-Cbl/die per via i.m. con MMA nella norma. Terapia con OHCbl s.c., 1 mg al giorno. MMA < 10 mmol/L su DBS(vn < 5) .

S., diagnosi di difetto di Cobalamina C mediante screening neonatale con second tier MMA di 93 umol/L e omocisteina di 57 umol/L. Mutazione MMACHC.(C.347T>C) Terapia OHCbl, 1 mg/die im e poi sc, e betaina. Valori di MMA su DBS sempre < 5 mmol/L Omocisteina plasmatica < 10 umol/L.

E., a 12 anni diagnosi di CblC per paraparesi spastica, encefalomielopatia, omocisteina plasmatica di 212 umol/L e MMA su DBS di 56.6 umol/L. Mutazione in omozigosi su gene MMACHC.(C.347T>C). Terapia con 1 mg di OH-Cbl ogni 12 ore s.c. associata a betaina. Omocisteina < a 15 uM/L e MMA < 5 umol/L.

L., diagnosi di Cobalamina B(CblB) all'età di 3 anni. Dieta ipoproteica e OH-Cbl, 1 mg/die per os; recente MMA su DBS di 1192 uM/L. Nuovo test di risposta alla B12 con somministrazione sc di 1mg per 7 giorni con riduzione MMA del 24% e dopo 2 mesi del 62%. Prosegue con 1 mg sc al giorno. MMA 588 umol/L.

RISULTATI: In 3 su 4 pazienti il MMA è nella norma e nei pazienti cblC anche l'omocisteina. Nel paziente CblB permane alterato ma migliorato rispetto ai precedenti.

DISCUSSIONE: In linea con Van Hove (2002) e Freshauf (2011) la nostra esperienza indica che la somministrazione della OH-Cbl per via sc con catetere a permanenza è efficace quanto la via i.m, riduce gli eventi dolorosi e migliora la compliance.

Persistenti anomalie biochimiche nel LCR di pazienti con acidemia metilmalonica sottoposti a trapianto: uno studio longitudinale.

Martinelli D¹, Ranucci G¹, Liccardo D², Catesini G¹, Semeraro M¹, Rizzo C¹, Maiorana A¹, Liguori A¹, Cotugno G¹, Candusso M², Spada M³, Grimaldi C³, Pariante R⁵, Bianchi R⁴, Dello Strologo L⁶, Dionisi-Vici C¹

¹UOC Pat Metab, Osp Ped Bambino Gesù, Roma, Italy, ²UOC Epatogastroent, Osp Ped Bambino Gesù, Roma, Italy, ³Ch Epatobiliopancr, Osp Ped Bambino Gesù, Roma, Italy, ⁴UOS Rianim pediatr, Osp Ped Bambino Gesù, Roma, Italy, ⁵A.R.C.O., Osp Ped Bambino Gesù, Roma, Italy, ⁶Trapianto Renale, Osp Ped Bambino Gesù, Roma, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Il trapianto epatico (LT) o renale (KT) sono proposti come trattamento potenzialmente curativo per l'acidemia metilmalonica, poiché riducono il rischio di scompenso e consentono un apporto proteico meno limitato. Sebbene gli organi trapiantati siano una fonte di enzima carente, essi correggono solo parzialmente il difetto biochimico. La produzione *de novo* di acido metilmalonico (MMA) nel SNC può contribuire infatti alla progressione del danno neurologico dopo il trapianto.

METODI/PAZIENTI: Per studiare l'effetto del LT o del trapianto fegato-rene (LKT) in soggetti con acidemia metilmalonica abbiamo effettuato misurazioni seriate di MMA nel plasma (118 campioni) e nel LCR (9 campioni) in 6 pazienti, tutti a dieta libera dopo il trapianto. I soggetti sono stati divisi in 2 gruppi: il primo (età 3-4 anni) includeva 2 pazienti sottoposti a LT e 1 a LKT; il secondo (età 19-43 anni) includeva 3 pazienti sottoposti a KT. I dati biochimici prima e dopo il trapianto sono stati confrontati con SPSS Statistics 21.0.

RISULTATI: I livelli medi di MMA nel plasma sono stati ridotti sia dal LT/LKT (620+390 vs 207+121 $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,0001$) che dal KT (2030+1793 vs 711+395 $\mu\text{mol/L}$; $p = 0,0112$). I valori più elevati di MMA plasmatico prima del trapianto nei soggetti sottoposti a KT sono dovuti all'insufficienza renale, mentre i livelli più alti dopo il trapianto sono dovuti probabilmente all'età più avanzata o ad una minore quantità di enzima fornita dal KT. A differenza del plasma, la concentrazione di MMA nel LCR non è stata modificata dal trapianto, con valori persistentemente elevati (476+215 vs 420+258 $\mu\text{mol/L}$) nei pazienti trattati con LT isolato o LKT.

DISCUSSIONE: Il nostro studio dimostra che il trapianto non influisce sui valori di MMA nel LCR. L'elevazione persistente dei metaboliti tossici può contribuire al progressivo danno neurologico. Questi dati sottolineano la necessità di nuove terapie dirette al SNC per migliorare l'outcome neurologico nell'acidemia metilmalonica.

Analisi quantitativa in LC-MS/MS di eparan solfato e dermatan solfato urinari tramite butanolisi.

Forni G¹, Malvagia S¹, Funghini S¹, Scolamiero E^{1,2}, Mura M¹, Della Bona M¹, Villanelli F¹, Damiano R^{1,2}, la Marca G^{1,2}

¹Lab Screen, Biochim e Farm, AOU Meyer, Firenze, Italy, ²Dip Sc Biomed Sperim e Clin, Unifi, Firenze, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: le Mucopolisaccaridosi (MPS) sono un gruppo di malattie d'accumulo lisosomiale caratterizzate da un aumento dell'escrezione urinaria di glicosamminoglicani (GAGs). Negli ultimi 10 anni, in seguito ai progressi effettuati in ambito diagnostico e terapeutico, il dosaggio di queste macromolecole ha assunto un'importanza sempre maggiore. La loro valutazione può essere utile sia come fattore di discriminazione tra i vari tipi di MPS sia per il follow-up clinico dei pazienti in trattamento. L'obiettivo di questo studio è stato la messa a punto di un nuovo metodo in LC-MS/MS per la quantificazione simultaneamente nelle urine di dermatan solfato (DS) ed eparan solfato (HS), la cui alterazione, seppur con pattern diversi, caratterizza la maggior parte delle MPS.

METODI / PAZIENTI: il protocollo analitico prevede la riduzione di queste macromolecole a dimeri, utilizzando la derivatizzazione chimica con butanolo. Due provette, con 5µL di urine ciascuna, vengono incubate con 75 µL di butanolo in HCl 1M per 60 min. a 90 °C e per 25 min. a 65 °C per l'analisi rispettivamente di HS e DS. Dopo la risospensione, i due prodotti di reazione vengono riuniti in un unico campione e analizzati simultaneamente in LC-MS/MS. La separazione cromatografica è effettuata con una colonna analitica Kinetex 2.6 µm Bifenile (Phenomenex) attraverso un gradiente di acetonitrile e acqua, entrambi acidificati con acido formico 0,1%, per un tempo totale di 21 minuti ad analisi.

RISULTATI: nonostante la disponibilità di varie tecniche analitiche per la quantificazione dei GAGs, il metodo descritto utilizza una procedura di semplice esecuzione con l'impiego di reagenti a basso costo e facilmente reperibili sul mercato.

DISCUSSIONE: grazie alla qualità e al livello di riproducibilità dei risultati ottenuti, tale metodo, potrebbe promuovere la standardizzazione delle procedure analitiche e incrementare l'utilizzo di queste analisi nella pratica clinica.

Ruolo della cromatografia nell'analisi dei sulfatidi su DBS in LC-MS/MS per conferma di leucodistrofia metacromatica

Villanelli F¹, Funghini S¹, Forni G¹, Malvagia S¹, Scolamiero E¹, Mura M¹, Della Bona M¹, Damiano R^{1,2}, la Marca G^{1,2}

¹Lab Screen, Biochim e Farm, AOU Meyer, Firenze, Italy, ²Dip Sc Biomed Sperim e Clin, Unifi, Firenze, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: I sulfatidi sono una classe di composti varia ed eterogenea e sebbene condividano tutti la struttura ceramidica di partenza, subiscono nel nostro organismo una serie di modificazioni che si traducono in differenze significative in termini di proprietà chimico fisiche. La varietà di composti e di abbondanze relative cambia in funzione dell'età e in associazione a patologie del sistema nervoso centrale. Le differenze, legate alla catena laterale, possono essere tali da originare una serie di composti isobari, con variazioni di peso molecolare non evidenziabili in spettrometria di massa, anche con sistemi ad alta risoluzione. Inoltre lo ione che si produce per frammentazione in MS/MS risulta essere lo stesso per tutti i sulfatidi. L'utilizzo della separazione cromatografica permette di separare gli isomeri al fine di identificarli e quantificarli; tra questi, ne sono stati selezionati alcuni come possibili marcatori della leucodistrofia metacromatica.

METODI: Il metodo messo a punto su spot di sangue permette di affrontare grandi numeri di campioni senza conseguenze per il sistema LC-MS/MS grazie ad un innovativo sistema di purificazione del campione, detto HLLC (Homogeneous Liquid-Liquid Extraction), basato su un sistema ternario di solventi. La separazione è stata ottenuta utilizzando una colonna C8, in fase inversa, in gradiente. I segnali relativi ai vari sulfatidi sono stati rivelati utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo in multiple reaction monitoring e elettrospray in ionizzazione positiva.

RISULTATI: I campioni preparati sono stati analizzati per il calcolo dei valori di riferimento per quattro classi di età. Sono stati analizzati campioni patologici e confrontati con i range di normalità ottenuti.

DISCUSSIONE: Il metodo ottenuto permette di identificare i campioni patologici, evidenziando la variazione di alcuni analiti (C16:0 e C16:0 OH) rispetto ai controlli, senza alterazione delle prestazioni cromatografiche.

Genetica della malattia di Niemann Pick C in Italia.

Dardis A¹, Zampieri S¹, Gellera C², Deodato F³, Carrozzo R³, Fiumara A⁷, Parini R⁵, Fecarotta S⁴, Santoro L⁶, Bordugo A⁹, Borroni B¹⁰, Toscano A⁸, Di Rocco M¹¹, Bembi B¹

¹Centre for Rare Diseases, Osp. Udine, Udine, Italy, ²IRCCS Besta, Milano, Italy, ³IRCCS. Bambino Gesù, Roma, Italy, ⁴Dip. Ped., Univ Federico II Napoli, Napoli, Italy, ⁵Osp. San Gerardo, Monza, Italy, ⁶Dep Ped, Osp. Univ. Ancona, Ancona, Italy, ⁷Dep Ped, Univ. Catania, Catania, Italy, ⁸Univ. Messina, Messina, Italy, ⁹Dep. Ped, Univ. Verona, Verona, Italy, ¹⁰Univ. Brescia, Brescia, Italy, ¹¹IRCCS Gaslini, Genova, Italy

Introduzione/background: La malattia di Niemann-Pick C (NPC) è un disordine da accumulo lisosomiale ad eredità autosomica recessiva dovuta a mutazioni nei geni *NPC1* o *NPC2*. Nel 2009 è stata pubblicata la caratterizzazione di 44 pazienti Italiani affetti da NPC. Lo scopo di questo lavoro è stato: (i) caratterizzare 56 nuovi pazienti affetti da NPC; (ii) eseguire un'analisi complessiva delle alterazioni molecolari dei geni NPC1 e NPC2 in pazienti Italiani.

METODI: La diagnosi di laboratorio dei nuovi pazienti è stata eseguita applicando l'algoritmo proposto in Patterson et al. 2017. In tutto, sono stati considerati 100 pazienti (93 NPC1; 7 NPC2); 6 con fenotipo clinico neonatale, 21 infantile precoce, 19 infantile tardivo, 20 giovanile e 25 adulto.

RISULTATI: Sono stati identificati 72 alleli NPC1 (14 nuovi) e 5 alleli NPC2. La patogenicità delle nuove mutazioni è stata confermata mediante analisi dell'mRNA, dell'espressione della proteina NPC1 e/o filipin staining (7/14) o tramite analisi in silico (7/14). Nei pazienti in cui è stato applicato l'algoritmo diagnostico completo solo un allele è rimasto sconosciuto. La mutazione F284LfsX26 è risultata la più frequente in pazienti NPC1 (6.1% degli alleli) mentre la p.I1061T (frequente in Europa) si è riscontrata solo nel 4.1% degli alleli. Il filipin staining è stato eseguito in 51 pazienti, 11 presentavano il fenotipo biochimico variante. Un'ampia variabilità fenotipica si è osservata fra pazienti NPC1, tuttavia la presenza di mutazioni severe in entrambi gli alleli è associata a fenotipi gravi, e la presenza di mutazioni missenso a fenotipi lievi. Una buona correlazione fenotipo/genotipo è stata trovata in pazienti NPC2.

DISCUSSIONE: nonostante la diagnosi di laboratorio di NPC sia piuttosto complessa, l'algoritmo diagnostico applicato ha consentito di stabilire il genotipo completo nel 98% dei pazienti. Inoltre, i risultati di questo lavoro forniscono una panoramica del profilo mutazionale dei geni NPC1/NPC2 in Italia.

Outcome metabolico-nutrizionale a lungo termine di pazienti affetti da Glicogenosi di tipo I

Montanari C¹, Rovelli V¹, Zuvadelli J¹, Banderali G¹, Morgano A¹, Re Dionigi A¹, Cefalo G¹, Salvatici E¹, Paci S¹

¹Cl Ped, Osp San Paolo, Univ Studi di Mi, Milano, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: La Glicogenosi di tipo I (GSD I), causata dal deficit di glucosio-6-fosfatasi, si presenta tipicamente con ipoglicemia a breve distanza dal pasto. Evitare il digiuno, con pasti piccoli e frequenti ricchi in carboidrati complessi, è il trattamento cardine, con un apporto quantitativo glucidico raccomandato di conseguenza superiore a quello della popolazione generale (60-70% dell'energia totale vs 45-60%). La dieta iperglucidica rappresenta noto fattore di rischio per lo sviluppo di obesità e insulino resistenza: scopo di questo studio è stato quindi valutare tali possibili complicanze in pazienti affetti da GSD I.

METODI / PAZIENTI: Sono stati raccolti i dati relativi a dietoterapia (kcal totali, % di macronutrienti, apporto di glucosio in mg/kg/min), glicemia, insulina (con calcolo HOMA-IR) e BMI di 14 pazienti affetti da GSD I (7 GSD IA, età media 24±11,8 anni e 7 GSD Ib età media 32,4±6,4 anni), a partire dalla diagnosi.

RISULTATI: La percentuale media di carboidrati prescritta (60-70%) non si modifica nel tempo, al contrario dell'apporto medio di glucosio (espresso in mg/kg/min) che, in età pediatrica, risulta inoltre superiore al quantitativo attualmente raccomandato. 2/14 pazienti (1 GSD Ia, 1 GSD Ib) hanno sviluppato insulino resistenza (HOMA-IR > 2.5) e obesità (BMI > 30 kg/m²) in età adulta.

DISCUSSIONE: L'“overtreatment nutrizionale” in pazienti affetti da GSD I è tradizionalmente associato al rischio di sviluppare obesità e insulino resistenza, seppure anche altri fattori (stile di vita, genetica) sembrano giocare un ruolo determinante, con estrema variabilità interindividuale. Il miglioramento della prognosi quod vitam di questi pazienti ha spostato l'obiettivo primario della gestione terapeutica dall'evitare esclusivamente l'ipoglicemia, garantendo la sopravvivenza, alla necessità di approcci dietetici non solo quantitativamente ma anche qualitativamente adeguati, al fine di prevenire le complicanze a lungo termine.

Il trattamento con GH ricombinante umano in pazienti MPS con deficit di GH: considerazioni su una *case series* di 4 pazienti

Cattoni A¹, Masera N¹, Gasperini S¹, Motta S¹, Parini R¹

¹Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Monza, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: Il trattamento con ormone della crescita ricombinante (rGH) è stato proposto nei pazienti affetti da mucopolisaccaridosi (MPS), affetti o no da concomitante deficit di GH (GHD). Sia per lo scarso numero di pazienti trattati, sia per la naturale evolutività delle malformazioni scheletriche in questi pazienti, non è ancora chiaro se questo trattamento porti un risultato positivo a lungo termine.

METODI/PAZIENTI: Abbiamo analizzato i pattern di crescita e le potenziali complicanze ortopediche in 4 pazienti MPS con GHD e trattate con rGH (due MPS 1H precedentemente sottoposte a trapianto di cellule staminali ematopoietiche, una MPS IVA e una MPS VI; età all'inizio del trattamento: 6.4, 6.7, 9.2, 8.8 anni rispettivamente). La diagnosi di GHD è stata posta nel caso di un picco di GH deficitario in due test dinamici eseguiti in giorni diversi.

RISULTATI: Significativo l'incremento della velocità di crescita, che ha invertito il *trend* di deflessione staturale: l'incremento medio dello z-score della velocità di crescita era pari a $+4.23 \pm 2.9$ a 6 mesi e $+4.55 \pm 0.96$ a 12 mesi dall'inizio trattamento. Dopo il primo anno di rGH, la velocità di crescita ha mostrato un rallentamento. In una ragazza MPS1H il trattamento è stato sospeso per scarsa efficacia, nelle tre rimanenti lo z-score dell'altezza si è mantenuto stabile nel tempo, permettendo una crescita regolare lungo il centile staturale iniziale. In corso di rGH, si è avuta progressione di alcune anomalie ortopediche già presenti prima dell'inizio del trattamento; in nessun caso nuove malformazioni si sono verificate in seguito. Due pazienti sottoposte a DXA *scan* prima e dopo l'inizio del rGH hanno avuto un significativo miglioramento della mineralizzazione ossea.

DISCUSSIONE: Nelle nostre pazienti MPS con GHD, la somministrazione di rGH ha verosimilmente contribuito all'incremento della mineralizzazione ossea, mentre non è chiaro se possa aver influito in modo consistente sulla crescita a lungo termine.

Pannello NGS per il sequenziamento del gene *ATP7B* e di 14 geni dell'omeostasi del rame in pazienti con Morbo di Wilson

Cinnirella G², Sapuppo A¹, Barresi V², Musso N², Gravina G², Di Mauro R², Bertino G¹, Condorelli D², Fiumara A¹

¹Dip di Medicina Clinica e Sperimentale, CATANIA, Italy, ²Dip Sc Bioch e Biotecn, Sez Bioch Med, CATANIA, Italy

INTRODUZIONE/BACKGROUND: La malattia di Wilson (WD) è una malattia genetica, che coinvolge i geni dell'omeostasi del rame ed è caratterizzata da mutazioni del gene *ATP7B*. La patogenesi è determinata dalla presenza di due mutazione del gene *ATP7B* ma, in base al metodo di sequenziamento utilizzato, non è sempre possibile rilevarne una delle due. In circa il 10% dei casi si trova solo una mutazione o nessuna. Pertanto, in questo lavoro, è stato deciso di valutare le mutazioni patogenetiche in pazienti affetti da WD con una o nessuna variante patogenetica di *ATP7B*.

METODI / PAZIENTI: E' stato disegnato un pannello Next-Generation Sequencing (NGS) mirato al sequenziamento del gene *ATP7B* e dei 14 geni coinvolti nell'omeostasi del rame (CHG) in una coorte di 17 pazienti italiani affetti da WD. L'analisi è stata estesa anche alla valutazione dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) in tutti i geni analizzati.

RISULTATI: 8 su 17 pazienti (58,82%) sono risultati eterozigoti composti per mutazioni patogene *ATP7B*, 5 erano eterozigoti semplici (29,41%), 2 omozigoti (11,76%), mentre nei restanti 2 pazienti (11,76%) non sono state rilevate mutazioni patogenetiche. I polimorfismi *ATP7B* a bassa frequenza c.1870-65G> A e c.51 + 110G> A erano significativamente aumentati nei pazienti WD rispetto a una popolazione di controllo di individui toscani (Italia) e ciò spinge ad ipotizzare che questi potrebbero comportarsi come varianti che possono avere un effetto sul fenotipo della malattia. Alcune varianti senza un chiaro significativo funzionale sono state rilevate nel gene *ATP7B* e nei 14 geni CHG.

DISCUSSIONE: In conclusione, sebbene sia stata rilevata un'alta percentuale (41,17%) di pazienti con una o nessuna mutazione patogenetica di *ATP7B*, è possibile che le mutazioni patogenetiche nelle regioni codificanti degli altri geni CHG non rappresentino la principale causa genetica di questo specifico sottogruppo di pazienti affetti da WD.