

La malattia di Pompe: guida alla diagnosi e alla terapia

A cura della Dott.ssa Lucia Morandi
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano



La malattia di Pompe: guida alla diagnosi e alla terapia

Anno XII, N. 9, luglio 2009

ISSN 1974-6679

ISBN 978 88 7556 452 0

La presente pubblicazione è tratta dal Supplemento n. 2 di *Neurology*, Volume 71, n. 23, dicembre 2008, al quale hanno collaborato:

Bruno Bemi, *Coordinamento Regionale per le Malattie Rare, Azienda Ospedaliero Universitaria "S. Maria della Misericordia", Udine*

Emma Cerini, *Terapia Intensiva Neonatale, Ospedale Civile "C. Poma", Mantova*

Cesare Danesino, *Genetica Medica, Università degli Studi di Pavia, Pavia*

Maria Alice Donati, *Sezione Malattie Metaboliche e Muscolari Ereditarie, AOU "A. Meyer", Firenze*

Serena Gasperini, *Sezione Malattie Metaboliche e Muscolari Ereditarie, AOU "A. Meyer", Firenze*

Lucia Morandi, *Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano*

Olimpia Musumeci, *UOC di Neuropatologia, AOU Policlinico "G. Martino", Messina*

Giancarlo Parenti, *Dipartimento di Pediatria, Università Federico II, Napoli; Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Napoli*

Sabrina Ravaglia, *Dipartimento di Neuroscienze, Fondazione "Istituto Neurologico C. Mondino" IRCCS, Pavia*

Fabrizio Seidita, *Presidente AIG, Associazione Italiana Glicogenosi, Pediatra di libera scelta, ASL 1 Milano*

Antonio Toscano, *Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Psichiatriche e Anestesiologiche e UOC di Neuropatologia, Università degli Studi di Messina, Messina*

Andrea Vianello, *Reparto di Fisiopatologia Respiratoria, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova*

Comitato Editoriale: Laura Brogelli, Giuliana Gerardo, Claudio Oliveri, Tiziana Satta, Siobhan Ward – **Redazione:** Rosy Bajetti

Produzione: Atlanta Biondi, Loredana Biscardi, Silvia Minora, Rita Sgreccia



Wolters Kluwer
Health

Adis

Wolters Kluwer Health Italy Ltd

Via B. Lanino, 5
20144 Milano

Via R. Gigante, 20
00143 Roma

© 2009 Wolters Kluwer Health

Therapy Perspectives. Registrazione del Tribunale di Milano n. 128 del 10 marzo 1997

Direttore responsabile: Giulio Zuanetti

Finito di stampare nel mese di luglio 2009 dalle Arti Grafiche M. Bazzi S.p.A. Milano

Pubblicazione fuori commercio riservata alla Classe Medica

Tutti i diritti sono riservati, compresi quelli di traduzione in altre lingue. Nessuna parte di questa pubblicazione potrà essere riprodotta o trasmessa in qualsiasi forma o per mezzo di apparecchiature elettroniche o meccaniche, compresi fotocopiatore, registrazione o sistemi di archiviazione di informazioni, senza il permesso scritto da parte dell'Editore. L'Editore è disponibile al riconoscimento dei diritti di copyright per qualsiasi immagine utilizzata della quale non si sia riusciti a ottenere l'autorizzazione alla riproduzione.

Nota dell'Editore: nonostante la grande cura posta nel compilare e controllare il contenuto di questa pubblicazione, l'Editore non sarà ritenuto responsabile di ogni eventuale utilizzo di questa pubblicazione nonché di eventuali errori, omissioni o inesattezze nella stessa.

Ogni prodotto menzionato deve essere usato in accordo con il Riassunto delle Caratteristiche di Prodotto fornito dalle Case Produttrici.

L'eventuale uso dei nomi commerciali ha soltanto lo scopo di identificare i prodotti e non implica suggerimento all'utilizzo.

Si ringrazia Genzyme S.r.l. per il contributo bibliografico fornito.

GZYZZZ5369

Indice

Introduzione	2
Diagnosi	3
Principali segni e sintomi	3
Metodi diagnostici	5
Controllo dei sintomi e terapia	8
Sintomi muscolari	8
Sintomi respiratori	9
Sintomi neurologici	10
Terapia enzimatica sostitutiva	10
Dieta a elevato contenuto proteico	11
Supporto psicologico	12
Counseling genetico	12

Introduzione

La malattia di Pompe, nota anche come glicogenosi di tipo II o deficit di maltasi acida, è una rara affezione genetica autosomica-recessiva, appartenente al gruppo delle miopatie da accumulo di glicogeno. Questa patologia, progressiva e spesso fatale, è causata da mutazioni nel gene che codifica per l'enzima lisosomiale α -glucosidasi acida (*acid alpha-glucosidase*, GAA), essenziale per la degradazione del glicogeno a glucosio. Il deficit totale o parziale dell'attività enzimatica della GAA ha come risultato l'accumulo di glicogeno all'interno dei lisosomi, con conseguente danno cellulare e tissutale. La malattia è multisistemica perché, nonostante l'accumulo di glicogeno sia più marcato nelle fibre muscolari, questo si osserva anche in altri tessuti. Benché il meccanismo responsabile del danno tissutale non sia ancora stato completamente definito, è chiaro che diversi fattori concorrono ad alterare la funzionalità cellulare. Studi in modelli animali della malattia di Pompe (topo *knockout* per il gene *GAA*) hanno chiaramente dimostrato che la presenza dei depositi di glicogeno, che sovvertono all'interno delle fibre muscolari l'apparato contrattile, compromette in modo significativo la funzione muscolare durante la contrazione^[1], con progressiva degenerazione delle fibre muscolari e sostituzione fibro-adiposa. La conseguenza finale di questo processo è la progressiva ipostenia muscolare, che si può osservare nelle forme gravi o nelle fasi avanzate della malattia. Tuttavia, la gravità della miopatia non sembra correlare esclusivamente con l'estensione del deposito di glicogeno e altri meccanismi sembrano essere coinvolti nella patogenesi del danno tissutale^[2,3]. Studi degli anni Ottanta hanno ipotizzato, come possibile ulteriore causa della perdita di forza, un'eccessiva proteolisi muscolare^[4], secondaria al rilascio nel citoplasma di enzimi idrolitici da parte dei lisosomi, in cui si accumula il glicogeno^[2].

Studi morfologici più recenti, condotti su fibre muscolari isolate da pazienti affetti dalla malattia di Pompe, hanno indicato nell'autofagia uno dei meccanismi responsabili della tossicità cellulare da accumulo di glicogeno^[5-7], soprattutto nelle fibre del

secondo tipo. L'eccessivo accumulo di autofagosomi nello spazio intracellulare compromette il traffico cellulare vescicolare e la funzione della fibra muscolare. Inoltre, questo processo può impedire l'accesso di agenti terapeutici (es. l'enzima ricombinante sostitutivo) ai lisosomi, nelle forme più avanzate della malattia^[5-7].

La malattia di Pompe ha una presentazione clinica complessa ed eterogenea. In base all'età d'esordio, si riconoscono tre forme di malattia:

- ▶ la forma classica e più grave, che si manifesta subito dopo la nascita e causa generalmente il decesso entro il primo anno di vita;
- ▶ la forma non classica, con esordio tra il primo e il secondo anno di vita, caratterizzata da una prognosi variabile;
- ▶ la forma a esordio tardivo, che può manifestarsi a qualsiasi età dopo il primo anno di vita ed è caratterizzata da una progressione lenta e da esiti meno sfavorevoli di quelli della forma classica.

Le principali manifestazioni cliniche nelle forme non classica e tardiva sono la progressiva perdita della funzionalità motoria e respiratoria causate dal considerevole indebolimento della muscolatura. Probabilmente anche a causa della sua rarità, la malattia di Pompe spesso non viene riconosciuta immediatamente. La diagnosi, così come il controllo e il trattamento dei sintomi, richiede uno sforzo su diversi fronti.

Per quanto riguarda gli interventi farmacologici, molte speranze sono riposte nella terapia enzimatica sostitutiva (*enzyme replacement therapy*, ERT) con GAA ricombinante, una terapia disponibile da pochi anni, che nel 2006 è stata approvata in Italia per il trattamento dei pazienti con diagnosi di malattia di Pompe.

Nel 2006-2007, un gruppo multidisciplinare di esperti italiani sulla malattia di Pompe si è riunito per fare il punto sulle tecniche diagnostiche e sulle terapie attualmente utilizzate nel trattamento di questa rara patologia^[8]. Uno degli obiettivi degli incontri è stato elaborare una strategia di sensibilizzazione dei medici – soprattutto di quelli che generalmente affrontano per primi i pazienti affetti dalla malattia – nei confronti della malattia di Pompe e dei sintomi, finora poco documentati e caratterizzati, che emergono nei pazienti la cui so-

pravvivenza è resa possibile dalla terapia con ERT. La presente pubblicazione illustra i principali aspetti emersi negli incontri e si rivolge in modo particolare ai neurologi, il cui contributo alla corretta diagnosi e gestione del paziente, così come all'ulteriore definizione dei meccanismi fisiopatologici coinvolti, appare indispensabile anche alla luce delle nuove terapie disponibili.

Diagnosi

A causa dell'eterogeneità e complessità delle manifestazioni cliniche, che variano secondo gli organi coinvolti, dell'età di comparsa e della gravità dei sintomi, la malattia di Pompe non è sempre facilmente riconoscibile. La variabilità e l'ampio spettro dei fenotipi clinici sono in parte dovuti alle diverse mutazioni nel gene *GAA*, che causano una completa o parziale riduzione dell'attività enzimatica residua. La misurazione di questa attività enzimatica residua è decisiva per la conferma della diagnosi ed è effettuabile in campioni di sangue o di tessuto muscolare del paziente. La disponibilità di test biochimici affidabili e rapidi è pertanto fondamentale.

I prossimi paragrafi si focalizzano principalmente sulle forme non classiche e tardive della malattia, che si manifestano dopo il primo anno di vita o più tardivamente. Da un'analisi di casi pubblicati in letteratura emerge che, in queste forme, l'età media di comparsa dei segni e dei sintomi della malattia è 24 anni, mentre l'età media alla diagnosi è 33 anni^[9], un dato, quest'ultimo, che conferma la difficoltà di un pronto riconoscimento della patologia.

Le principali caratteristiche cliniche associate alle varie forme della malattia di Pompe sono riassunte nella *Tabella 1*. La prognosi è infausta nella forma classica, in cui è presente la cardiomiopatia, mentre nelle altre forme la progressione della malattia può essere più lenta e il grado di disabilità moderato.

Principali segni e sintomi

Apparato motorio

Il danno a carico del sistema muscoloscheletrico riscontrato nei pazienti affetti dalla malattia di Pompe è generalmente simmetrico e può coinvolgere tutti

i gruppi muscolari, ma colpisce maggiormente i muscoli prossimali rispetto a quelli distali e gli arti inferiori rispetto ai superiori^[10,11]. L'aspetto pseudoipertrofico spesso osservato in alcuni muscoli, dovuto all'accumulo di glicogeno nel tessuto muscolare, si associa generalmente a una notevole ipostenia, soprattutto a carico del tricipite surale, dei quadricipiti, dei deltoidi e dei muscoli paraspinali. Il danno muscolare, inoltre, può coinvolgere anche i muscoli della masticazione e della lingua, con gravi conseguenze per la capacità di deglutire e di masticare. Il deficit stenico può causare gravi alterazioni della postura e una progressiva limitazione della funzione motoria (*vedi Tabella 1*), con contratture muscolari e retrazioni tendinee che contribuiscono ad aggravare ulteriormente il grado di disabilità del paziente. Un'ulteriore possibile limitazione deriva, anche nelle fasi iniziali di malattia, dalla fatica muscolare, definita come ridotta tolleranza all'esercizio^[1]. La ridotta attività fisica e il ridotto carico possono infine essere causa di osteoporosi.

L'*imaging* muscolare mediante tomografia computerizzata (TC) e risonanza magnetica (RM) evidenzia la pseudoipertrofia muscolare o la sostituzione fibro-adiposa del tessuto muscolare, che appare come tessuto di minore densità nella TC (*Figura 1*) e come una zona iperintensa nell'immagine pesata in T1 nella RM (*Figura 2*).

Apparato respiratorio

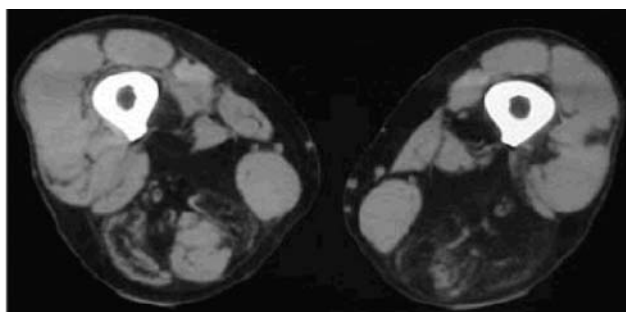
La malattia di Pompe si associa anche a un considerevole indebolimento dei muscoli respiratori (diaframma, muscoli intercostali e accessori). Il coinvolgimento dei muscoli respiratori può verificarsi precocemente, causando gravi problemi respiratori nel paziente che è ancora in grado di muoversi e di lavorare (*vedi Tabella 1*)^[10,12]. Nel 30% dei casi rappresenta il sintomo iniziale della malattia e si accompagna a cefalea, sonnolenza e/o dispnea^[10,13]. L'insufficienza respiratoria è la causa maggiore di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da glicogenosi di tipo II^[14,15] ed è dovuta all'incapacità dei muscoli respiratori (in particolare il diaframma) di generare livelli normali di pressione e flusso durante l'inspirazione e l'espirazione. Inoltre, i muscoli respiratori addominali e intercostali sono necessari anche per tossire e quindi per l'espettorazione di se-

Tabella 1. Principali caratteristiche cliniche dei pazienti con malattia di Pompe

	Forma infantile classica	Forma infantile non classica	Forma tardiva	
			Forma giovanile	Forma dell'adulto
Età d'esordio	< 12 mesi (solitamente entro i primi mesi di vita)	< 2 anni	> 2 anni < 18 anni	> 18 anni
Cuore	Cardiomiopatia ipertrofica Aritmie Insufficienza cardiorespiratoria	Possibile lieve cardiomiopatia	Generalmente nessun interessamento cardiaco	Generalmente nessun interessamento cardiaco
Muscolatura scheletrica	Ipotonia grave e progressiva (bambino molle tipo "bambola di pezza")	Ipotonia progressiva	Miopatia scheletrica	Miopatia scheletrica Intolleranza all'esercizio Ipostenia dei cingoli Lombalgia
Capacità motorie	Ritardo nell'acquisizione o regressione delle tappe motorie	Ritardo nell'acquisizione o regressione delle tappe motorie	Possibile regressione delle tappe motorie	Possibile perdita della capacità motoria
Respirazione	Infezioni respiratorie ricorrenti	Infezioni respiratorie ricorrenti	Possibili problemi respiratori a partire dalla seconda decade di vita	Insufficienza respiratoria Apnea durante il sonno Dispnea da esercizio Infezioni respiratorie
Altro	Epatomegalia Macroglossia	Possibile epatomegalia Possibile macroglossia	Epatomegalia (rara) Macroglossia (rara)	Epatomegalia (rara) Macroglossia (rara) Interessamento del SNC (molto raro) Aneurisma cerebrale (raro)
Parametri di laboratorio	AST/ALT, CK elevate	AST/ALT, CK elevate	AST/ALT, CK elevate	AST/ALT elevate CK normale o elevata
Prognosi	Morte entro 12 mesi	Variabile	Variabile	In presenza di moderata debolezza muscolare si hanno lenta progressione della malattia e moderata disabilità motoria Con interessamento muscolare importante e in presenza di stress respiratorio la prognosi può essere molto sfavorevole

ALT, alanina aminotransferasi; AST, aspartato aminotransferasi; CK, creatinichinasi; SNC, sistema nervoso centrale.

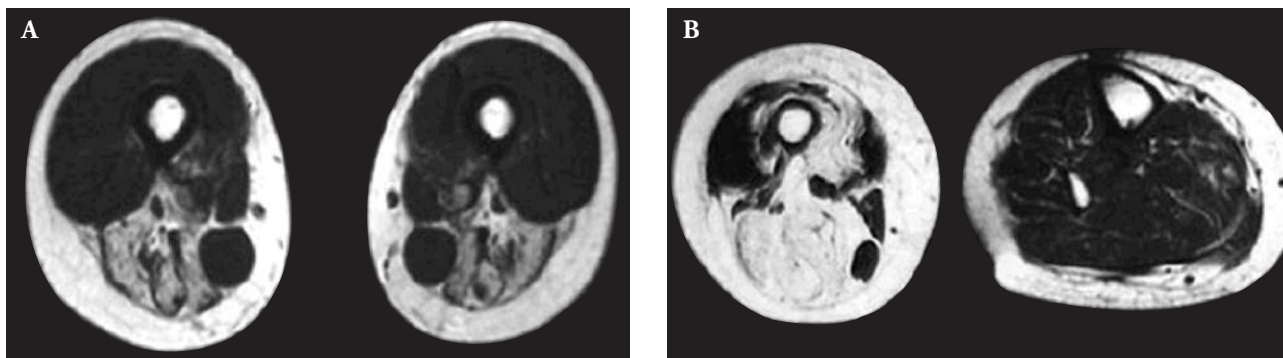
Figura 1. Tomografia computerizzata della coscia di un paziente affetto da glicogenosi di tipo II. Età del paziente: 72 anni. Gravità della malattia: moderata. Ridotta densità del tessuto muscolare da degenerazione fibro-adiposa.



crezioni bronchiali. Di conseguenza, il paziente affetto da glicogenosi di tipo II può essere soggetto a infezioni bronchiali ricorrenti con accumulo di catarro, che possono degenerare in polmonite, atelettasia e insufficienza respiratoria.

Infine, in alcuni pazienti i disturbi respiratori sono prevalentemente notturni (*sleep-disordered breathing*, SDB), con prolungate e frequenti apnee o ipoventilazione, o entrambe. L'ipoventilazione è la manifestazione più comune di SDB nei pazienti con glicogenosi di tipo II e riguarda circa due terzi dei pazienti.

Figura 2. Risonanza magnetica di muscoli di pazienti affetti da glicogenosi di tipo II. **A)** Coscia di un paziente di 44 anni, con glicogenosi di tipo II, moderatamente grave. **B)** Coscia (sinistra) e gamba (destra) di un paziente di 62 anni con grave glicogenosi di tipo II (il paziente era in grado di camminare per alcuni metri, se assistito). La sostituzione adiposa a livello della coscia è quasi completa. Malgrado la gravità dell'interessamento della coscia, i muscoli della gamba appaiono risparmiati (riprodotta da^[8]).



Sistema nervoso centrale

La letteratura e le evidenze cliniche che descrivono segni e sintomi di tipo neurologico nella malattia di Pompe sono molto scarse (vedi Tabella 1). Diversi studi *post-mortem* condotti all'inizio degli anni Settanta hanno descritto la presenza di depositi di glicogeno e una ridotta attività della GAA in varie aree del sistema nervoso centrale^[16-18]. Il deficit dell'attività enzimatica non era tuttavia accompagnato da alterazioni patologiche o sintomi neurologici^[18].

Uno studio più recente ha confrontato le alterazioni a livello del sistema nervoso centrale di bambini e adulti con glicogenosi di tipo II^[19]. Negli adulti non sono state riscontrate alterazioni, mentre nei bambini è stato osservato un importante coinvolgimento dei motoneuroni spinali e dei gangli della radice dorsale. Né i bambini né gli adulti presentavano alterazioni a livello dei neuroni corticali.

Due recenti casi fatali di ipertensione resistente ai comuni trattamenti verificatisi in due bambini, di cui uno in trattamento con ERT, hanno suggerito che l'accumulo di glicogeno nel sistema nervoso centrale potrebbe portare ad alterazioni della termoregolazione^[20,21].

Infine, è stata recentemente descritta una significativa ipoacusia neurosensoriale, con probabile interessamento del nervo acustico, in 4 su 7 pazienti con glicogenosi di tipo II^[22]. L'analisi patologica su un modello animale della malattia (topo *knockout* per il gene *GAA*) ha dimostrato la presenza di depositi di glicogeno e conseguenti alterazioni patologiche a livello della coclea.

Un danno cerebrale indirettamente causato dall'accumulo di glicogeno è rappresentato dagli aneurismi descritti in una serie di *case reports* riguardanti pazienti adulti affetti dalla malattia di Pompe^[23-26]. Gli autori ipotizzano che l'accumulo di glicogeno nella muscolatura liscia dei vasi cerebrali potrebbe essere la causa di queste emorragie.

Complessivamente, gli esperti sono concordi sul fatto che in fase diagnostica non sono strettamente necessarie analisi di tipo neurologico. Sottolineano, tuttavia, l'importanza di un coinvolgimento dei neurologi e il fatto che una maggiore conoscenza degli effetti della malattia di Pompe sul sistema nervoso contribuirà a capirne a fondo la fisiopatologia. Non si può inoltre escludere che la ERT, allungando la sopravvivenza del bambino, riveli sintomi neurologici della malattia finora sconosciuti o poco caratterizzati.

Metodi diagnostici

Algoritmo diagnostico

In generale, la valutazione clinica del paziente con sospetta malattia di Pompe deve includere:

- ▶ esami del sangue (AST/ALT, LDH, CK);
- ▶ elettrocardiogramma, ecografia cardiaca, radiografia del torace;
- ▶ valutazione della funzionalità polmonare e monitoraggio delle infezioni respiratorie ricorrenti;
- ▶ esami elettrofisiologici (elettromiografia, velocità di conduzione nervosa);
- ▶ biopsia muscolare per esame istologico e dosaggio dell'attività enzimatica.

La diagnosi di glicogenosi di tipo II deve essere confermata mediante un dosaggio dell'attività enzimatica della GAA su campioni prelevati dal paziente (linfociti, fibroblasti, tessuto muscolare). Dopo conferma della presenza di un deficit nell'attività della GAA, è consigliabile procedere alla caratterizzazione della mutazione dell'enzima eseguendo un'analisi molecolare.

La diagnosi differenziale della malattia di Pompe include malattie neurologiche, cardiomiopatie e altre miopatie congenite e metaboliche e richiede, pertanto, la collaborazione tra specialisti, inclusi i neurologi. Le diagnosi differenziali per le varie forme della malattia sono riassunte nella *Tabella 2*.

Dosaggio dell'attività enzimatica

La misurazione dell'attività enzimatica della GAA è essenziale per confermare la diagnosi di malattia di Pompe. Si ha conferma della diagnosi quando l'attività è assente o quando è significativamente ridotta rispetto a quella di un controllo sano. Negli adulti con glicogenosi di tipo II, l'attività residua della GAA è più elevata che in altre forme della malattia e può essere inclusa tra il 2% e il 40% dell'attività in un individuo sano^[8]. Il valore prognostico dell'attività residua non è stato stabilito con certezza. Benché esista una correlazione tra il livello di attività residua e la gravità della malattia, è opinione condivisa dagli esperti che il decorso della malattia sia

Tabella 2. Diagnosi differenziale della malattia di Pompe nell'adulto e nel bambino

ADULTO		
Gruppi di patologie	Malattia	Sintomi in comune
Distrofie muscolari	Distrofia muscolare di Becker Distrofie muscolari dei cingoli Atrofia muscolare scapolo-peroneale Sindrome della colonna rigida	Indebolimento progressivo della muscolatura prossimale Deambulazione caratteristica "dandinante" CK elevata
Disturbi metabolici ereditari	Malattie da accumulo di glicogeno (deficit di: enzima ramificante, enzima deramificante, miofosforilasi, fosfofruttochinasi) Malattia di Danon Malattie mitocondriali (anomalie della catena respiratoria, della beta-ossidazione)	Dolore muscolare, affaticamento, miopatia prossimale, CK elevata, epatomegalia (rara) Cardiomiopatia, miopatia, accumulo di glicogeno nei vacuoli Miopatia, CK elevata, epatomegalia
Miopatie infiammatorie	Polimiosite	Miopatia prossimale, CK elevata, dolore muscolare
BAMBINO		
Atrofia muscolare spinale	Malattia di Werdnig-Hoffmann	Grave ipotonia
Distrofie muscolari	Distrofie muscolari congenite (Duchenne-Becker e cingoli)	Ipotonia, cardiomiopatia
Miopatie congenite	Miopatia nemalinica, <i>fiber type disproportion</i> , <i>central core</i>	Ipotonia, cardiomiopatia
Malattie metaboliche ereditarie	Glicogenosi, malattie mitocondriali Malattie perossisomiali Difetti congeniti di glicosilazione	Cardiomegalia, miopatia, CK elevata, epatomegalia Ipotonia, epatomegalia Epatopatia, cardiomiopatia, ipotonia
Malattie cardiache congenite	Cardiomiopatia ipertrofica idiopatica, miocardite, fibroelastosi endocardica	Cardiomegalia, insufficienza cardiaca, difficoltà di nutrizione
Malattie da accumulo lisosomiale	Malattia di Danon	Cardiomiopatia, miopatia, accumulo di glicogeno nei vacuoli
Altro	Ipotiroidismo	Cardiomegalia, miopatia, accumulo di glicogeno nei vacuoli

CK, creatinichinasi.

determinato anche da altri fattori genetici, così come da fattori ambientali.

L'attività della GAA è determinata mediante un test biochimico nel quale si possono utilizzare substrati sintetici (4-metilumbelliferil- α -D-glucoside) o naturali (maltosio, glicogeno). Nella forma classica della malattia non si riscontra praticamente alcuna attività enzimatica, mentre nelle forme più tardive si possono misurare vari livelli di attività residua. Il test può essere eseguito su colture di fibroblasti (ottenuti da biopsie cutanee), su biopsie muscolari, linfociti purificati, cellule mononucleate, linee cellulari linfoidi. I leucociti totali comunemente impiegati nei test enzimatici utilizzati per la diagnosi di altre malattie da accumulo lisosomiale non sono adatti nella malattia di Pompe, poiché la presenza di altri enzimi che utilizzano gli stessi substrati potrebbe mascherare il deficit di GAA^[27]. Recentemente sono stati messi a punto test in cui l'interferenza da parte di altri enzimi viene ridotta aggiungendo inibitori specifici per gli altri enzimi. In questo modo è possibile eseguire il test enzimatico su campioni facilmente e rapidamente ottenibili, come i linfociti o una goccia di sangue essiccata su carta da filtro bibula^[28]. I metodi che utilizzano gocce di sangue essiccate sono stati ampiamente convalidati nello screening dei neonati e come primo test diagnostico rapido e poco costoso che permette di evitare, in caso di mancata conferma della diagnosi, inutili accertamenti invasivi e costosi. Se, al contrario, il test condotto su questo tipo di campioni indica un deficit di GAA, è consigliabile eseguire la misurazione dell'attività dell'enzima secondo il metodo standard, su colture di fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee. Queste possono essere prelevate in anestesia locale e i risultati sono generalmente disponibili dopo 1-2 mesi. Le colture possono essere utilizzate anche per i test molecolari ed essere congelate per impieghi successivi. Il test dell'attività della GAA può essere eseguito anche su biopsie muscolari, che sono generalmente prelevate per eseguire analisi istologiche. La biopsia muscolare è tuttavia un procedimento invasivo, che in alcuni casi può richiedere anestesia generale e che comporta, quindi, dei rischi soprattutto nel paziente cardiomiopatico. Il test può essere condotto su tessuto muscolare congelato ed è più rapido di quello sulle colture di fibroblasti.

Un altro test, potenzialmente molto utile in fase preliminare, è l'analisi dei livelli dell'oligomero Glc α 1-6Glc α 1-4Glc α 1-4Glc (Glc4) nell'urina. Livelli elevati di Glc4 sono stati riscontrati nell'urina di pazienti con glicogenosi di tipo II ed è stato dimostrato che correlano con gli esiti della ERT^[29]. Come test diagnostico, in combinazione con il test con goccia di sangue essiccata su carta da filtro bibula, l'analisi dell'urina può essere utilizzata come tecnica di screening per confermare o escludere rapidamente la presenza della patologia. Inoltre, se la correlazione tra esito della ERT e livelli di Glc4 nell'urina sarà confermata in studi di più ampie dimensioni, questo test diventerà molto importante per ottimizzare il regime di terapia sostitutiva da adottare.

Analisi molecolare

Dopo conferma della diagnosi mediante test biochimico, l'identificazione della mutazione nel gene *GAA* non è strettamente necessaria. Tuttavia, il test molecolare è di notevole importanza perché permette di identificare in modo inconfutabile il portatore di una mutazione ed è quindi fortemente consigliato a tutti i parenti prossimi di un paziente, soprattutto nel caso questi avessero l'intenzione di avere un figlio. Per alcune mutazioni comuni, inoltre, esiste un'utile correlazione tra genotipo e fenotipo. Un esempio è dato dalla mutazione *splice site c.-32-13T>G*, che si riscontra soprattutto nei pazienti adulti (fino all'85% dei casi in uno studio italiano)^[30]. Finora sono state identificate più di 200 mutazioni diverse^[31] e un gruppo di ricerca dell'Università Erasmus di Rotterdam ha compilato un elenco delle mutazioni note e della loro incidenza in diverse popolazioni. Questo e altri contributi all'analisi delle varie mutazioni permetteranno di definire le correlazioni tra genotipo e fenotipo del paziente, essenziali anche per stabilire la prognosi e la terapia da adottare. È infatti molto probabile che la risposta al trattamento sostitutivo con l'enzima ricombinante possa dipendere anche dal tipo di mutazione presente.

Nel prossimo futuro, l'analisi molecolare diventerà quindi molto importante per stabilire quali pazienti avranno maggiori probabilità di trarre beneficio da questo tipo di terapia.

Esami istologici

In presenza di marcati sintomi muscolari, la biopsia muscolare può contribuire alla diagnosi. Va tuttavia notato che le alterazioni morfologiche associate alla patologia, inclusi i depositi di glicogeno, variano considerevolmente da un soggetto all'altro e che soggetti affetti dalla malattia possono presentare una biopsia normale.

L'analisi istologica con le comuni reazioni isto-enzimatiche è in grado di evidenziare la presenza di vacuoli contenenti glicogeno e positivi alla fosfatasi acida, a conferma della presenza di una patologia lisosomiale.

Le biopsie muscolari possono inoltre essere utilizzate per misurare la quantità di glicogeno depositato. È stata osservata una correlazione tra quantità di glicogeno depositato ed età di esordio della malattia, con maggiore accumulo di glicogeno nei neonati. Anche in questo caso, tuttavia, bisogna tenere presente che queste correlazioni devono essere interpretate con cautela e che il loro valore prognostico non è dimostrato.

Imaging muscolare

In presenza di chiari sintomi muscolari o per escludere un possibile coinvolgimento muscolare, i pazienti possono essere sottoposti a TC o RM muscolare. La letteratura sull'impiego di queste tecniche nella valutazione della patologia muscolare in pazienti con malattia di Pompe è molto limitata^[32-35]. Tuttavia, l'esperienza clinica nell'analisi di immagini, in modo particolare degli arti inferiori, è sempre più ampia, pertanto si cominciano a riconoscere alcuni aspetti caratteristici della malattia. Come discusso in precedenza, queste tecniche, che rilevano pseudoipertrofia del tessuto muscolare e infiltrazione adiposa, permettono di evidenziare caratteristiche che distinguono questa miopatia dalle altre miopatie (vedi *Figure 1 e 2*) e che sono quindi importanti anche per la diagnosi differenziale.

Rispetto alla TC, la RM è più sensibile nell'identificare la sostituzione fibro-adiposa e ha una risoluzione maggiore^[36]. Inoltre, l'assenza di radiazioni ionizzanti nella RM permette di ripetere le misurazioni in tempi relativamente ravvicinati, in modo tale da valutare la progressione della malattia o la risposta al trattamento. Gli svantaggi associati alla

RM sono i costi elevati e i lunghi tempi richiesti per l'imaging, che possono risultare difficili da tollerare per un bambino o per un paziente con insufficienza respiratoria.

Controllo dei sintomi e terapia

La malattia di Pompe compromette la funzionalità di diversi apparati, può debilitare gravemente il paziente e il suo trattamento richiede un intervento multidisciplinare. Inoltre, a causa dei molteplici meccanismi coinvolti nel danno cellulare e tissutale, è ragionevole attendersi che un singolo agente terapeutico non sia sempre sufficiente ad assicurare un controllo adeguato dei sintomi e che i diversi stadi della malattia richiedano la combinazione di differenti approcci terapeutici.

La scoperta del difetto genetico responsabile di questa patologia ha aperto le porte alla ERT, che è stata approvata in diversi Paesi, inclusa l'Italia, nel 2006. I risultati dei primi studi *open label* e dei primi studi clinici, attualmente in corso, sono brevemente discussi oltre, assieme ad altre indicazioni per il controllo dei sintomi. La *Tabella 3* offre una visione d'insieme degli attuali approcci terapeutici e di follow-up del paziente adulto.

Sintomi muscolari

Valutazione

- La valutazione della forza muscolare può essere eseguita mediante diversi test convalidati. Il più comune è il *manual muscle testing*, che misura la forza di distinti gruppi muscolari, valutando la capacità del paziente di muovere un muscolo contro la forza di gravità e contro una resistenza. La forza muscolare può essere quantificata mediante la scala a punti del *Medical Research Council* (MRC), (0 = assenza di contrazione, 5 = normale forza muscolare)^[37]. Questo test purtroppo non è molto affidabile sia per la soggettività dell'esaminatore, sia per la variabilità della prestazione del paziente. Inoltre è difficilmente utilizzabile per la valutazione di muscoli molto compromessi. Queste difficoltà hanno portato alla messa a punto di

Tabella 3. Valutazione e controllo dei sintomi nel paziente adulto. Le valutazioni dei sintomi sono da eseguire anche nel corso di una terapia farmacologica (es. ERT) e nel follow-up del paziente.

Sintomi	Valutazione	Misure di prevenzione/riabilitazione
Debolezza e fatica muscolare	Forza muscolare, scala MRC (test manuale o con dinamometro) Fatica muscolare (scala RHS)	Dieta a elevato contenuto proteico Moderato esercizio aerobico Educazione posturale Fisioterapia
Problemi respiratori	Esame fisico (addome) Test di funzionalità polmonare (spirometria, volumi polmonari) Forza dei muscoli respiratori (MIP, MEP) CPEF Polisonnografia in caso di SDB Radiografia del torace in caso di polmonite o atelettasia	Ventilazione non invasiva (NPPV) Tecniche di tosse assistita Qualsiasi intervento di agevolazione della respirazione
Sistema nervoso centrale	Potenziali evocati uditivi del tronco encefalico Test audiometrico RM del cervello RM del cervello + angiografia Test psicometrico	Allo stato attuale delle conoscenze, i sintomi a carico del SNC sembrano essere molto rari

CPEF, picco espiratorio della tosse; ERT, terapia enzimatica sostitutiva; MEP, pressione espiratoria massima; MIP, pressione inspiratoria massima; MRC, *Medical Research Council*; NPPV, ventilazione a pressione positiva non invasiva; RHS, *Rotterdam Handicap Scale*; RM, risonanza magnetica; SDB (sleep-disordered breathing), disturbi respiratori nel sonno; SNC, sistema nervoso centrale.

test quantitativi, come la valutazione della massima contrazione isometrica mediante miometro^[38,39].

- Valutazione della fatica muscolare: un recente studio ha analizzato l'affidabilità della *Rotterdam Handicap Scale* (RHS), sviluppata per valutare l'impatto di patologie neuromuscolari sulla funzionalità nella vita quotidiana dei pazienti con glicogenosi di tipo II^[40]. Gli autori hanno concluso che questa scala è adeguata anche nella malattia di Pompe.

Controllo

- Prevenzione del catabolismo muscolare: è stato dimostrato che una dieta a elevato contenuto proteico, arricchita di aminoacidi ramificati e accompagnata da un programma specifico di fisioterapia, favorisce la sintesi proteica a livello muscolare in pazienti pediatrici e adulti (vedi oltre).
- Moderato esercizio aerobico quotidiano: può contribuire a ridurre il deposito di glicogeno e ad aumentare la sintesi proteica a livello muscolare. Sono consigliate attività come nuoto e bicicletta (moderando lo sforzo e in assenza di eccessiva resistenza) per aumentare la forza muscolare e per ridurre l'atrofia da disuso.

- Fisioterapia per la prevenzione delle retrazioni tendinee e delle contratture muscolari e per correggere la postura ed eventuali deformità.
- Nell'ambito della gestione dei sintomi muscoloscheletrici va ricordato che la malattia di Pompe influisce, a diversi livelli, anche sul metabolismo osseo, determinando osteoporosi.

Sintomi respiratori

Valutazione

- Lo sviluppo dell'insufficienza respiratoria nella malattia di Pompe è spesso insidioso, soprattutto quando si verifica parallelamente alla perdita della capacità motoria. È quindi frequente che i sintomi respiratori non siano prontamente riconosciuti.
- L'esame fisico è essenziale perché può evidenziare anomalie addominali nel corso della respirazione e la presenza di muco (ingombro bronchiale) nelle vie aeree inferiori e superiori.
- Test di funzionalità polmonare (spirometria, volumi polmonari) devono essere eseguiti di routine nella valutazione del paziente con glicogenosi di tipo II, sia in posizione supina sia in posizione

seduta, al fine di valutare la funzionalità del diaframma.

- ▶ Valutazione della forza dei muscoli respiratori: altamente raccomandata, perché molto sensibile e utile per la prognosi. Una pressione inspiratoria massima (*maximum inspiratory pressure*, MIP) altamente negativa (> 80 cm H₂O) o una pressione espiratoria massima (*maximum expiratory pressure*, MEP) altamente positiva (> 90 cm H₂O) permette di escludere la presenza di debolezza clinicamente rilevante dei muscoli inspiratori ed espiratori.
- ▶ Il picco espiratorio della tosse (*cough peak expiratory flow*, CPEF) è l'unico parametro in grado di determinare se la capacità di eliminare le secrezioni bronchiali è preservata (CPEF < 160 - 270 L/min) indica una scarsa clearance delle vie aeree^[41].
- ▶ L'emogasanalisi è eseguita in presenza di segni clinici che indicano un deterioramento significativo della funzionalità polmonare o in presenza di desaturazione durante il sonno. L'insufficienza ventilatoria può verificarsi improvvisamente, pertanto questa analisi non è un indicatore adeguato di questo rischio^[42].
- ▶ I pazienti con SDB dovrebbero essere sottoposti a un attento monitoraggio notturno, se possibile mediante polisonnografia^[43]. Si raccomanda di eseguire questa misurazione al primo riscontro della malattia, in modo tale da avere un dato basale che servirà, successivamente, per controllare il decorso della malattia o la risposta a una terapia.
- ▶ La radiografia del torace è consigliata in caso di polmonite o di atelettasia.

Controllo

- ▶ Terapia di ventilazione non invasiva (per pazienti che non necessitano di una ventilazione costante): la ventilazione a pressione positiva non invasiva (*non-invasive pressure ventilation*, NPPV), per esempio, può essere facilmente impiegata a domicilio^[44,45]; non modifica il decorso della malattia, ma migliora la sopravvivenza e la qualità di vita e riduce il ricorso alle cure ospedaliere.
- ▶ Tecniche di tosse assistita: tecniche manuali non invasive o dispositivi per l'insufflazione/essufflazione meccanica.
- ▶ È necessario intervenire su qualsiasi fattore che pos-

sa aggravare la compromissione polmonare, come asma (broncodilatatori e steroidi inalati), reflusso gastroesofageo (H₂-antagonisti, inibitori della pompa protonica, agenti procinetici) e aspirazione di cibo nell'albero tracheo-bronchiale durante l'alimentazione.

Sintomi neurologici

Alla luce delle scarse conoscenze dell'impatto della malattia di Pompe sul sistema nervoso centrale, gli esperti raccomandano di sottoporre il paziente ai seguenti esami:

- ▶ esami neurologici annuali, con una particolare attenzione alle manifestazioni a livello del sistema nervoso centrale;
- ▶ RM del cervello (dopo diagnosi di glicogenosi di tipo II e sintomi neurologici centrali) ogni 2 anni;
- ▶ RM del cervello e angiografia nel caso di una sospetta anomalia della vascolarizzazione cerebrale;
- ▶ potenziali evocati uditivi del tronco encefalico;
- ▶ test audiometrico;
- ▶ test psicometrico.

Terapia enzimatica sostitutiva

La terapia enzimatica sostitutiva con alglucosidasi alfa (GAA ricombinante) è disponibile dal 2000^[46] e nel 2006 è stata approvata in Italia per il trattamento della malattia di Pompe con diagnosi confermata. Studi con questo tipo di terapia, soprattutto nella forma tardiva, sono attualmente in corso.

Efficacia

- ▶ Effetti sulla cardiomiopatia ipertrofica nel bambino: gli studi sinora pubblicati suggeriscono in modo consistente l'efficacia di questa terapia sui sintomi cardiaci associati alla forma classica della malattia^[21,46-52].
- ▶ Effetti sulla muscolatura scheletrica: i dati di efficacia pubblicati non sono ancora conclusivi, in particolare nei pazienti adulti. L'evidenza attualmente disponibile suggerisce che i pazienti con miopatia in fase iniziale abbiano maggiori probabilità di trarre beneficio dal trattamento^[21,46-54]. Per questa ragione, gli esperti suggeriscono di iniziare il trattamento il più presto possibile.
- ▶ I risultati preliminari di uno studio controllato con

placebo^[55] mostrano la superiorità della ERT rispetto al placebo nel migliorare la capacità motoria e la funzionalità polmonare in un gruppo di 90 pazienti di età > 8 anni.

- ▶ In tre pazienti in terapia da 8 anni, la ERT ha stabilizzato la funzionalità polmonare e ridotto la fatica muscolare. Uno di questi pazienti, di 11 anni d'età, è stato in grado di abbandonare la sedia a rotelle^[56].

Tollerabilità

- ▶ A parte un caso di sindrome nefrosica^[55], non sono stati osservati eventi avversi gravi associati alla terapia. Nella maggior parte dei casi i pazienti sviluppano anticorpi contro la proteina ricombinante^[21,46-48,50-52,54,57].

Protocollo di trattamento

- ▶ La posologia comunemente impiegata è 20 mg/kg di alglucosidasi alfa somministrata per infusione endovenosa una volta ogni 14 giorni; la terapia è cronica. Il trattamento deve essere somministrato in centri specializzati e da personale esperto in questo tipo di terapia.
- ▶ Prima di intraprendere il trattamento si raccomanda di sottoporre il paziente agli esami clinici (in particolare funzionalità motoria e respiratoria), in modo da avere una documentazione delle condizioni al basale. Gli stessi esami devono essere eseguiti nel follow-up.
- ▶ Secondo le evidenze attualmente disponibili, la ERT dà maggiori benefici se somministrata in uno stadio iniziale della malattia.

Terapia enzimatica sostitutiva con GAA ricombinante

- ▶ Migliora in modo significativo la sopravvivenza dei pazienti con la forma classica della malattia.
- ▶ Riduce significativamente la cardiomiopatia.
- ▶ Migliora la funzionalità polmonare e riduce la fatica muscolare.
- ▶ È verosimilmente più efficace se somministrata in uno stadio iniziale della malattia.

Dieta a elevato contenuto proteico

Il razionale per l'utilizzo di una dieta ad alto tenore di proteine, con eventuale supplemento di aminoacidi, si basa sull'ipotesi che il progressivo danno muscolare derivi anche dalla proteolisi del tessuto muscolare. Secondo alcuni studi^[58-60], una dieta ricca di proteine, pur non migliorando complessivamente gli esiti della malattia, ne rallenta la progressione; i benefici riguardano soprattutto la funzionalità muscolare del paziente.

La dieta raccomandata sulla base di questi studi è costituita dal 25-30% di proteine, dal 30-35% di carboidrati e dal 35-40% di grassi. Supplementi di L-alanina per via orale (1,5 g 4 volte al giorno) sono possibili se il paziente ritiene troppo elevato l'apporto proteico della dieta^[60]. Alcuni autori^[58] sottolineano l'importanza di associare a una dieta di questo tipo l'esercizio fisico quotidiano, con lo scopo di diminuire i depositi di glicogeno e aumentare l'utilizzo di lipidi da parte del muscolo. Gli stessi autori sottolineano la necessità di un attento monitoraggio della compliance nel caso si adotti questo approccio^[58].

Un'altra misura utilizzata in combinazione con la dieta e l'esercizio è l'impiego di agonisti beta-2 stimolanti, che causano una riduzione della massa grassa corporea e un aumento dell'utilizzo di glicogeno^[61]. Tuttavia, l'utilità di questo approccio non è stata studiata a fondo e, in caso di cardiomiopatia, la terapia con agonisti beta-2 stimolanti deve essere valutata molto attentamente.

Trattamento dietetico del paziente con malattia di Pompe

- ▶ Composizione della dieta: 25-30% di proteine, 30-35% di carboidrati, 35-40% di grassi.
- ▶ Supplementi, se il paziente non riesce a raggiungere la quantità di proteine indicata: L-alanina 1,5 g 4 volte al giorno e aminoacidi ramificati 4% 500 ml.
- ▶ I risultati sono migliori se la dieta è combinata a moderato esercizio fisico.
- ▶ Misure di supporto: efedrina, albuterolo (tuttavia sconsigliati in caso di cardiomiopatia).

Supporto psicologico

Come per tutte le malattie gravi, progressive e debilitanti, anche per la malattia di Pompe il supporto psicologico al paziente e alla sua famiglia ha un ruolo cruciale nella gestione di questa condizione.

È fondamentale che il paziente e i suoi familiari siano adeguatamente informati sulla malattia e coinvolti nelle decisioni riguardanti il trattamento. Altrettanto cruciale è evitare che le persone colpite si sentano isolate e finiscano effettivamente per esserlo. Di grande aiuto in questo senso è l'attività di associazioni a carattere nazionale e internazionale, sulla cui esistenza le famiglie coinvolte dovrebbero essere informate.

Il paziente adolescente è particolarmente vulnerabile da un punto di vista psicologico. Oltre ai problemi psicologici normalmente associati alla pubertà, l'adolescente colpito dalla malattia deve affrontare quelli ancora più complessi legati alla sua condizione.

Gli esperti riconoscono nel paziente adolescente essenzialmente tre modi di affrontare la malattia:

- ▶ la regressione, nella quale il paziente adotta comportamenti infantili e di dipendenza;
- ▶ la negazione della malattia, che si associa a un comportamento autonomo e indipendente, ma che purtroppo porta a una scarsa compliance alle terapie;
- ▶ l'intellettualizzazione o razionalizzazione della malattia, che porta l'adolescente a voler capire e conoscere la propria condizione.

Quest'ultimo atteggiamento deve essere incoraggiato, perché aiuta a controllare le ansie e le paure e a sviluppare solide strategie di difesa; favorisce, inoltre, la collaborazione tra paziente e medico.

Counseling genetico

La malattia di Pompe è un disturbo genetico autosomico recessivo che colpisce in ugual misura maschi e femmine. I genitori di un bambino colpito dalla malattia sono portatori sani e i fratelli e le sorelle hanno una probabilità del 25% di essere affetti dalla malattia e una probabilità del 50% di essere portatori sani. Si stima che la frequenza della malattia di Pompe nella popolazione generale sia di 1 ogni 40.000 individui. La frequenza delle mutazioni del gene appare relativamente elevata e si stima che 1 individuo ogni 100 sia portatore della malattia^[62].

Di fronte a una diagnosi confermata di malattia di Pompe, i familiari del paziente devono essere incoraggiati a partecipare a un programma di counseling genetico, il cui scopo non è solo individuare i portatori sani della mutazione del gene *GAA* e stabilire, pertanto, il rischio di avere figli ammalati, ma è anche identificare tempestivamente i soggetti che potrebbero sviluppare i sintomi in età adulta. La diagnosi precoce e, quindi, l'inizio della ERT in uno stadio iniziale della malattia si associano a un esito più favorevole.

Sono disponibili anche test biochimici per la diagnosi prenatale, che misurano l'attività della *GAA* nei villi coriali^[63] o nel liquido amniotico. Per una coppia di genitori entrambi portatori, l'assenza di attività enzimatica fornisce un'informazione certa sul fatto che il bambino svilupperà la forma classica della malattia con prognosi molto sfavorevole. Nel caso, invece, sia presente un'attività enzimatica residua (o siano presenti mutazioni associate a forme più tardive della malattia), allo stato attuale delle conoscenze l'interpretazione dei risultati è complessa, così come la previsione degli esiti postnatali. È molto importante, prima di ogni test di diagnosi prenatale, assicurarsi che i genitori siano consapevoli dei limiti di questo tipo di diagnosi.

Bibliografia

1. Hesselink RP, Gorselink M, Schaart G, et al. *Muscle Nerve* 2002; 25: 873-83
2. Griffin JL. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1984; 45: 23-36
3. Hesselink RP, Wagenmakers AJ, Drost MR, van der Vusse GJ. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1637: 164-70
4. Slonim AE, Coleman RA, McElligot MA, et al. *Neurology* 1983; 33: 34-8
5. Raben N, Roberts A, Plotz PH. *Acta Myol* 2007; 26: 45-8
6. Raben N, Takikita S, Pittis MG, et al. *Autophagy* 2007; 3: 546-52
7. Fukuda T, Ewan L, Bauer M, et al. *Ann Neurol* 2006; 59: 700-8
8. *Neurology* 2008; 71 (Suppl. 2): S1-36
9. Winkel LP, Hagemans ML, van Doorn PA, et al. *J Neurol* 2005; 252: 875-84
10. Kishnani PS, Howell RR. *J Pediatr* 2004; 144 (5 Suppl.): S35-43
11. Hirschhorn R, Reuser A. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *New York, NY: McGraw-Hill*, 2001: 3389-420
12. Pellegrini N, Laforet P, Orlikowski D, et al. *Eur Respir J* 2005; 26: 1024-31
13. Hagemans ML, Winkel LP, van Doorn PA, et al. *Brain* 2005; 128: 671-7
14. Dubowitz V. In: *Muscle Disorders in childhood*, 2nd ed. London: WB Saunders Co, 1995
15. Reuser AJ, Kroos MA, Hermans MM, et al. *Muscle Nerve* 1995; 3: S61-9
16. Martin JJ, de Barsey T, van Hoof F, Palladini G. *Acta Neuropathol* 1973; 23: 229-44
17. Gambetti P, DiMauro S, Baker L. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971; 30: 412-30
18. DiMauro S, Stern LZ, Mehler M, et al. *Muscle Nerve* 1978; 1: 27-36
19. van der Walt JD, Swash M, Leake J, Cox EV. *Muscle Nerve* 1987; 10: 272-81
20. Martini C, Ciana G, Benettoni A, et al. *Neurology* 2001; 57: 906-8
21. van den Hout JM, Kamphoven JH, Winkel LP, et al. *Pediatrics* 2004; 113: e448-57
22. Kamphoven JH, de Ruiten MM, Winkel LP, et al. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 14-20
23. Anneser JM, Pongratz DE, Podskarbi T, et al. *Neurology* 2005; 64: 368-70
24. Braunsdorf WE. *Neurosurgery* 1987; 21: 748-9
25. Makos MM, McComb RD, Hart MN, Bennett DR. *Ann Neurol* 1987; 22: 629-33
26. Matsuoka Y, Senda Y, Hirayama M, et al. *J Neurol* 1988; 235: 371-3
27. Dreyfus JC, Poenaru L. *Pediatr Res* 1980; 14: 342-4
28. Umapathysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ. *Clin Chem* 2001; 47: 1378-83
29. An Y, Young SP, Kishnani PS, et al. *Mol Genet Metab* 2005; 85: 247-54
30. Montalvo AL, Bembi B, Donnarumma M, et al. *Hum Mutat* 2006; 27: 999-1006
31. Kroos M, Pomponio RJ, van Vliet L, et al. *Hum Mutat* 2008; 29: E13-26
32. Cinnamon J, Slonim AE, Black KS, et al. *AJNR Am J Neuroradiol* 1991; 12: 1099-103
33. de Jager AE, van der Vliet TM, van der Ree TC, et al. *Muscle Nerve* 1998; 21: 398-400
34. Pichiecchio A, Uggetti C, Ravaglia S, et al. *Neuromuscul Disord* 2004; 14: 51-5
35. Arai Y, Osawa M, Shishikura K, et al. *Brain Dev* 1993; 15: 147-52
36. Mercuri E, Cini C, Counsell S, et al. *Eur J Paediatr Neurol* 2002; 6: 309-14
37. Medical Research Council. London: HM Stationary Office, 1976
38. Escolar DM, Henricson EK, Mayhew J, et al. *Muscle Nerve* 2001; 24: 787-93
39. Merlini L, Mazzone ES, Solari A, Morandi L. *Muscle Nerve* 2002; 26: 64-70
40. Hagemans ML, Laforêt P, Hop WJ, et al. *Neuromuscul Disord* 2007; 17: 537-43
41. Polkey MI, Green M, Moxham J. *Thorax* 1995; 50: 1131-5
42. Rochester DF, Esau SA. *Clin Chest Med* 1994; 15: 751-63
43. Lofaso F, Quera-Salva MA. *Eur Respir J* 2002; 19: 989-90
44. Mellies U, Stehling F, Dohna-Schwake C, et al. *Neurology* 2005; 64: 1465-7
45. Puruckherr M, Pooyan P, Girish MR, et al. *Sleep Med* 2004; 5: 379-81
46. van den Hout H, Reuser AJ, Vulto AG, et al. *Lancet* 2000; 356: 397-8
47. Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, et al. *Genet Med* 2001; 3: 132-8
48. Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, et al. *Neurology* 2007; 68: 99-109
49. Kishnani PS, Nicolino M, Voit T, et al. *J Pediatr* 2006; 149: 89-97
50. Klinge L, Straub V, Neudorf U, et al. *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 24-31
51. Klinge L, Straub V, Neudorf U, Voit T. *Neuropediatrics* 2005; 36: 6-11
52. van den Hout JM, Reuser AJ, de Klerk JB, et al. *J Inher Metab Dis* 2001; 24: 266-74
53. Rossi M, Parenti G, Della Casa R, et al. *J Child Neurol* 2007; 22: 565-73
54. Winkel LP, van den Hout JM, Kamphoven JH, et al. *Ann Neurol* 2004; 55: 495-502
55. van der Ploeg A, Clemens P, Corzo D, et al. 60th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, 2008. www.aan.com. Ultima consultazione: luglio 2009
56. van Capelle CI, Winkel LP, Hagemans ML, et al. *Neuromuscul Disord* 2008; 18: 447-52
57. Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, et al. *Genet Med* 2006; 8: 267-88
58. Slonim AE, Bulone L, Goldberg T, et al. *Muscle Nerve* 2007; 35: 70-7
59. Ravaglia S, Pichiecchio A, Rossi M, et al. *J Inher Metab Dis* 2006; 29: 590
60. Bodamer OA, Haas D, Hermans MM, et al. *Pediatr Neurol* 2002; 27: 145-6
61. Angelini C, Nascimbeni AC. *Clin Genet* 2007; 71: 374-5
62. Aulsems MG, ten Berg K, Kroos MA, et al. *Community Genet* 1999; 2: 91-6
63. Besançon AM, Castelnau L, Nicolesco H, et al. *Clin Genet* 1985; 27: 479-82

