

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

Workshop  
**Aggiornamento su diagnosi  
e terapie delle malattie lisosomiali**

Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 7 novembre 2005

**RIASSUNTI**

A cura di  
Rosa Salvioli e Anna Maria Vaccaro  
*Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare*

ISSN 0393-5620  
**ISTISAN Congressi**  
**05/C8**

Istituto Superiore di Sanità

**Workshop. Aggiornamento su diagnosi e terapie delle malattie lisosomiali. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 7 novembre 2005. Riassunti.**

A cura di Rosa Salvioli e Anna Maria Vaccaro  
2005, iv, 29 p. ISTISAN Congressi 05/C8

Il Workshop si propone di fare il punto della situazione sulle malattie lisosomiali, un gruppo di malattie genetiche rare causate dalla mancanza di attività di alcuni enzimi idrolitici con conseguente accumulo di metaboliti non degradati nei lisosomi. Il Workshop fornirà un panorama delle attuali conoscenze scientifiche, diagnostiche e terapeutiche in questo settore. In particolare verranno illustrati i più recenti risultati della ricerca sulla patofisiologia delle malattie lisosomiali che hanno permesso di perfezionare i metodi di diagnosi e di sviluppare trattamenti e prevenzione. Le acquisizioni scientifiche finora raggiunte hanno portato all'elaborazione di efficaci protocolli da utilizzare nella cura dei pazienti. Durante il Workshop verrà valutata l'efficacia delle terapie già disponibili quali il trattamento enzimatico sostitutivo e verranno presentati i progressi fatti nello sviluppo di nuovi approcci terapeutici (terapia genica, cellule staminali). A conclusione della giornata è prevista una tavola rotonda dedicata alla discussione delle più rilevanti problematiche riguardanti vari aspetti organizzativi inerenti alla diagnosi e alla terapia delle malattie lisosomiali.

*Parole chiave:* Malattie lisosomiali, Sfingolipidosi, Mucopolisaccaridosi, Terapia enzimatica sostitutiva, Terapia genica.

Istituto Superiore di Sanità

**Workshop. Updating on diagnosis and therapies of lysosomal diseases. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 7 November, 2005. Abstract book.**

Edited by Rosa Salvioli and Anna Maria Vaccaro  
2005, iv, 29 p. ISTISAN Congressi 05/C8

The Workshop illustrates recent advances in the understanding of lysosomal diseases, a group of rare genetic diseases caused by the deficiency of hydrolytic enzymes and the consequent storage of undigested metabolites in lysosomes. The Workshop will provide an up-to-date with scientific, diagnostic and therapeutic developments in this field. Particularly, the most recent results of the research on pathological mechanisms, that have contributed to improve diagnostic methods and to develop therapies and prevention, will be presented. The last scientific data have enabled to develop successful protocols for treatment of patients suffering from lysosomal diseases. The efficacy of the available therapies, like the enzyme replacement therapy, and the progress made in the development of new therapeutic approaches (gene therapy, stem cells) will be discussed. A Round Table about organizing aspects related to the diagnosis and the therapies of lysosomal diseases will conclude the Workshop.

*Key words:* Lysosomal diseases, Sphingolipidoses, Mucopolysaccharidosis, Enzyme replacement therapy, Gene therapy.

Si ringrazia Raia Vincenzo per il supporto tecnico.

Per informazioni su questo documento scrivere a: [salvioli@iss.it](mailto:salvioli@iss.it).

Il rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2005 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

# INDICE

<b>Programma</b> .....	iii
<b>Prima Sessione</b>	
Basi molecolari e aspetti clinici delle malattie lisosomiali.....	1
<b>Seconda Sessione</b>	
Nuovi approcci di diagnosi delle malattie lisosomiali.....	7
<b>Terza Sessione</b>	
Aggiornamento sugli interventi terapeutici per le malattie lisosomiali .....	15
<b>Indice degli autori</b> .....	29



## PROGRAMMA

### 7 novembre 2005

- 9.00 Saluto di benvenuto  
**Cesare Peschle**  
*Direttore del Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare*

#### Prima Sessione

#### **BASI MOLECOLARI E ASPETTI CLINICI DELLE MALATTIE LISOSOMIALI**

*Moderatori:* Bruno Bembi, Roberta Ricci

- 9.15 *Patofisiologia delle sfingolipidosi*  
**Anna Maria Vaccaro**
- 9.45 *Dalla clinica alla diagnosi delle malattie da accumulo lisosomiale*  
**Maria Alice Donati**

#### Seconda Sessione

#### **NUOVI APPROCCI DI DIAGNOSI DELLE MALATTIE LISOSOMIALI**

*Moderatori:* Paola Di Natale, Anna Maria Vaccaro

- 10.15 *Prevenzione e diagnosi precoce delle malattie da accumulo lisosomiale:  
dallo studio familiare allo screening neonatale*  
**Enrico Zammarchi**
- 10.45 Intervallo
- 11.00 *Malattia di Gaucher: correlazione genotipo-fenotipo*  
**Mirella Filocamo**
- 11.30 *Alterazioni nel catabolismo degli sfingolipidi nelle sfingolipidosi*  
**Rosa Salvioli**

#### Terza Sessione

#### **AGGIORNAMENTO SUGLI INTERVENTI TERAPEUTICI PER LE MALATTIE LISOSOMIALI**

*Moderatori:* Carlo Dionisi-Vici, Enrico Zammarchi

- 12.00 *Terapia enzimatica sostitutiva per la malattia di Fabry*  
**Roberta Ricci, Mario Castorina, Daniela Antuzzi**

- 12.30 *Modelli di terapia cellulare ed enzimatica per le mucopolisaccaridosi*  
**Maurizio Scarpa**
- 13.00 Intervallo
- 14.00 *Terapia genica per la mucopolisaccaridosi I e per la mucopolisaccaridosi III B  
in modelli murini*  
**Carmela Di Domenico, Paola Di Natale**
- 14.30 *Mucopolisaccaridosi di tipo II. Messa a punto di un protocollo di terapia genica*  
**Maria Pia Cosma**
- 15.0 *La riduzione farmacologica del substrato nelle sfingolipidosi:  
una nuova possibilità terapeutica*  
**Bruno Bembi**
- 15.30 *Cellule staminali e GM2 gangliosidosi*  
**Sabata Martino, Aldo Orlacchio**
- 16.00 *Il ruolo del Ministero della Salute nell'organizzazione degli interventi terapeutici  
nell'ambito delle malattie lisosomiali*  
**Nello Martini**
- 16.30 **Tavola rotonda**  
**MALATTIE LISOSOMIALI:**  
**PROBLEMATICHE DIAGNOSTICHE E TERAPEUTICHE**

**Prima Sessione**

**Basi molecolari e aspetti clinici  
delle malattie lisosomiali**

*Moderatori*

Bruno Bembi, Roberta Ricci



## PATOFISIOLOGIA DELLE SFINGOLIPIDOSI

Anna Maria Vaccaro

*Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Le malattie lisosomiali sono un gruppo di più di 40 malattie genetiche causate per lo più dalla mancanza di attività di specifici enzimi degradativi e dal conseguente accumulo di metaboliti nei lisosomi. Le basi enzimatiche, genetiche e molecolari delle malattie lisosomiali sono state in gran parte chiarite, ma rimane ancora da definire in molti casi quali siano esattamente i processi metabolici che vengono alterati direttamente o indirettamente dal difetto genetico primario, dando luogo alle varie disfunzioni cellulari e tissutali caratteristiche delle singole patologie.

Le malattie lisosomiali sono state raggruppate seguendo criteri diversi. La classificazione ancora più in uso si basa sulla natura del substrato accumulato. Quindi le mucopolisaccaridosi sono state così definite perché presentano accumulo lisosomiale di mucopolisaccaridi per difetti di esoglicosidasi o solfatasi o trasferasi. Analogamente nelle sfingolipidosi si ha accumulo di sfingolipidi, nelle oligosaccaridosi si ha accumulo di oligosaccaridi, ecc. Non sempre queste classificazioni possono essere così nette. Talvolta più di una classe di macromolecole può funzionare da substrato per un singolo enzima il cui deficit provoca quindi accumulo di substrati diversi. Per esempio un difetto in un enzima che degrada oligosaccaridi può risultare nell'accumulo di glicolipidi, glicoproteine e proteoglicani.

Le sfingolipidosi sono dovute ad un blocco nella degradazione lisosomiale degli sfingolipidi causato da mutazioni avvenute in specifici enzimi degradativi, le sfingolipidi idrolasi, o negli attivatori proteici di queste idrolasi (le saposine e il GM2 *activator factor*). Singolarmente le sfingolipidosi sono malattie rare, ma collettivamente esse raggiungono una frequenza di 1 su circa 18.000 nati vivi e sono la più comune causa di patologie neurodegenerative in età pediatrica.

Le sfingolipidosi sono in genere malattie monogeniche, cioè causate da mutazioni in un unico gene che codifica per una singola proteina (nella maggior parte dei casi un enzima). Alcune mutazioni possono causare la completa perdita dell'attività enzimatica mentre altre determinano solo una parziale riduzione della funzionalità dell'enzima. La più comune sfingolipidosi è la malattia di Gaucher, dovuta a mutazioni della glucosilceramidasi (GCasi), l'enzima che degrada il glucosilceramide (GC) o dell'attivatore proteico della GCasi, la saposina C. Nostri recenti lavori hanno messo in evidenza il ruolo fisiologico della Sap C. Infatti è stato dimostrato che questa saposina si lega preferenzialmente a membrane contenenti fosfolipidi acidi, alterandone la struttura fisica e promuovendo l'attacco della GCasi alla superficie lipidica. La ricostituzione della attività enzimatica implica quindi la formazione di un complesso tra GCasi, Sap C e fosfolipidi acidi sulla superficie delle membrane lisosomiali.

L'aver definito questo modello ci ha permesso di comprendere meglio alcuni meccanismi fisiopatologici alla base della malattia di Gaucher. È stato infatti evidenziato che la mutazione più frequentemente riscontrata nella GCasi, la N370S (sostituzione

dell'asparagina in posizione 370 con una serina), altera profondamente l'affinità dell'enzima per il complesso Sap C-fosfolipidi anionici inibendo di conseguenza il contatto fisico tra l'enzima e i suoi attivatori fisiologici. Si può quindi concludere che l'alterata funzionalità della N370S GCasi dipende più da una mancata attivazione che da una ridotta capacità catalitica. In altre parole, la N370S GCasi, non riuscendo a formare il complesso con la Sap C e i fosfolipidi acidi, non è in grado di esprimere la sua potenziale attività.

Il ruolo fondamentale delle saposine nella degradazione degli sfingolipidi da parte delle idrolasi lisosomiali è dimostrato anche dall'identificazione di varianti di leucodistrofia metacromatica causate da mutazioni nella Sap B. Quest'ultima saposina è indispensabile all'arilsolfatasi A (ASA) per la degradazione dei solfatidi. Il meccanismo di azione della Sap B è diverso da quello della Sap C e si basa sulla formazione di un complesso solubile tra Sap B e sfingolipidi, che solo in questa forma possono venire degradati dalle corrispondenti idrolasi.

Recentemente un accumulo lisosomiale di sfingolipidi, quali glucosilceramide, sfingomieline e gangliosidi è stato riscontrato anche nella malattia di Niemann-Pick tipo C (NPC), una patologia lisosomiale che non era stata considerata in origine una sfingolipidosi. Questa malattia è dovuta alla mancanza di una proteina, chiamata appunto NPC1, di cui non si conosce ancora l'esatta funzione anche se si sa che è coinvolta nel trasporto di lipidi dai lisosomi ad altre membrane cellulari. Le cellule NPC sono caratterizzate dall'accumulo di colesterolo in aberranti organelli cellulari che contengono markers caratteristici sia dei *late endosomes* che dei lisosomi. Poiché alcune ricerche indicano proprio nell'accumulo di sfingolipidi il fattore patogenetico della NPC, abbiamo voluto investigare quale fosse la causa dell'accumulo di glucosilceramide riscontrato in questa patologia. I risultati della nostra ricerca hanno dimostrato che il colesterolo presente nei fibroblasti dei pazienti rende instabile la GCasi e inibisce la colocalizzazione dell'enzima con il suo attivatore, la Sap C. Quindi l'accumulo di GC in cellule NPC dipende dall'eccesso di colesterolo che interferisce sulla funzionalità dell'enzima.

Questi esempi evidenziano la complessità che sottende la patofisiologia delle malattie lisosomiali. Per arrivare ad efficaci strategie terapeutiche è indispensabile una approfondita conoscenza delle proprietà degli enzimi lisosomiali e dei loro cofattori. L'identificazione, la purificazione e la caratterizzazione funzionale e strutturale di alcune sfingolipidi idrolasi hanno finora permesso di mettere a punto trattamenti enzimatici sostitutivi. Una migliore definizione dei processi degradativi degli sfingolipidi potrà offrire in futuro nuovi spunti per migliorare gli approcci terapeutici attualmente disponibili.

## DALLA CLINICA ALLA DIAGNOSI DELLE MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE

Maria Alice Donati

*Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Firenze*

Le malattie d'accumulo lisosomiale (LSD) sono un gruppo di malattie clinicamente eterogeneo anche nell'ambito di uno stesso difetto biochimico. Sono conosciuti circa 50 differenti LSD secondarie a difetti di specifiche proteine con progressivo accumulo di materiale non degradato nei lisosomi. La maggior parte delle LSD diagnosticate si presentano nei primi anni di vita o in età pediatrica; in quest'ultimi anni è sempre più frequente la diagnosi in pazienti con forme varianti ad esordio in età adulta-avanzata. Sono importanti l'anamnesi familiare e segni clinici chiave perché il quadro clinico può essere non evidente in fase precoce, specie in varianti lievi.

*Anamnesi familiare.* Consanguineità dei genitori o appartenenza gruppi etnici con elevata endogamia (malattie per lo più ad eredità autosomica recessiva), fratelli con medesima sintomatologia supportano il sospetto clinico. È noto che alcune malattie sono frequenti in alcune etnie: es. m. di Gaucher e m. di Tay-Sachs in ebrei askenamiti, aspartilglucosaminuria in Finlandia, quest'ultima malattia molto rara in Italia è stata diagnosticata in pazienti per lo più provenienti dalla Sicilia.

*Età di esordio.* L'esordio di una certa sintomatologia può essere specifico di un difetto o di pochi difetti. Alcune LSD possono manifestarsi con idrope fetale ricorrente, epatosplenomegalia, teleagectasie cutanee; il rilievo di linfociti vacuolati nello striscio periferico alla nascita può essere la prima conferma di LSD. In caso di feto morto è importante lo studio microscopico e ultrastrutturale placentare e coltura di cellule amniotiche per studi enzimatici successivi. Un quadro neonatale grave con idrope, ittiosi, organomegalia e artrogriposi è presente nella m. di Gaucher severa infantile. Un prolungato ittero (colestatico) neonatale è presente nella m. di Niemann-Pick C. Schematicamente possiamo distinguere tre tipi di presentazione delle LSD: neurologica, sistemica, d'organo/i non neurologica.

*Presentazione neurologica.* Segni chiave sono arresto-regressione psicomotoria, decorso progressivo, manifestazioni neurologiche specifiche, neuroimmagini indicative (leucodistrofia), alterazioni oculari (macchia rosso-ciliegia, opacità corneali ecc.), neuropatia. Se l'esordio è nei primi mesi non sono state ancora raggiunte tappe importanti dello sviluppo e può essere difficile rilevare arresto-regressione psicomotoria (utili foto e video) per cui spesso la diagnosi è di sofferenza perinatale. La leucodistrofia metacromatica (MLD) tardo-infantile ha esordio tra 6 mesi e 4 anni e accanto alle manifestazioni neurologiche può mostrare sintomatologia addominale, spesso dolorosa, per colecistite, pancreatite e massa addominale conseguenti a deposito di sulfatidi nella colecisti; una ecografia addominale può mostrare il coinvolgimento colecistico; altro segno clinico lo strabismo che è presente quasi costantemente in fase precoce. Le forme tardive di m. di Krabbe e di MLD possono mostrare un esordio in età senile e decorso molto lento. Nella MLD tipo adulto sono distinguibili due varianti cliniche: "forma motoria" e forma "psico-cognitiva" La prima è caratterizzata da prevalenti disturbi motori e neuropatia periferica

(talora diagnosi non corretta di sclerosi multipla). La seconda è caratterizzata da prevalenti disturbi psichiatrici e deterioramento mentale (diagnosi non corretta di schizofrenia o di psicosi maggiore). Recentemente è stato riportato un fenotipo atipico adulto con neuropatia periferica isolata. Nella MLD vi è alterazione della sostanza bianca periventricolare con distribuzione simmetrica. Nelle forme giovanile e adulta è stato osservato un coinvolgimento soprattutto frontale e del corpo calloso, le fibre ad U sono risparmiate; è inoltre possibile un coinvolgimento cerebellare. Quando le manifestazioni sono sistemiche o d'organo il sospetto clinico di malattia d'accumulo può essere più agevole.

- Dismorfismi faciali possono essere evidenti e precoci come nella mucopolisaccaridosi (MPS) IH e nella mucolipidosi II (facies Hurler-like con marcata ipertrofia gengivale) ma talora inizialmente sfumati e diventare progressivamente significativi. Importante rivalutare il paziente nel tempo.
- Alterazioni cutanee possono essere molto utili, ad es. l'associazione ittiosi, leucodistrofia e disostosi multipla è indicativa di deficit multiplo di solfatasi; altre alterazioni possono essere le teleangectasie cutanee (gangliosidosi GM1 tipo I, sialidosi) e l'ipertricosi con sopracciglia folte (associata a disturbi del comportamento nella MPS III). Nell'emizigote Fabry le tipiche lesioni vasculo-cutanee rosso-violacee (angiocheratomi) compaiono nelle regioni glutee, inguino-scrotali, ombelicale all'adolescenza o nel giovane adulto; nel 90% dei ragazzi il sintomo che porta dal pediatra sono le crisi dolorose "agoniche" alle estremità, di durata da minuti a settimane, scatenate spesso da malattie intercorrenti, variazioni metereologiche, stress, esercizio fisico, la frequente presenza di febbre ed elevata VES portano erroneamente a diagnosi di malattia reumatica.
- Cardiomiopatia ad esordio nei primi mesi, associata a ipotonia, è presente nella m. di Pompe infantile, l'associazione invece a disostosi, splenomegalia, dismorfismi può indirizzare verso gangliosidosi GM1 tipo I variante o mucopolisaccaridosi; anche in questi casi lo striscio periferico mostra alterazioni indicative di LSD. È stata descritta una variante cardiaca della m. di Fabry caratterizzata da cardiomiopatia in età adulta ma assenza o presenza solo di alcuni sintomi cardinali della malattia (angiocheratomi, opacità corneali, acroparestesie, proteinuria); l'analisi di  $\alpha$ -galattosidasi in gruppi di pazienti affetti da ipertrofia ventricolare sinistra ha portato all'individuazione di nuovi casi.
- Epato e/o splenomegalia possono essere molto evidenti o di lieve entità; l'associazione a manifestazioni neurologiche progressive (gangliosidosi GM1 tipo I, MPS, sfingolipidosi...) o l'associazione a scarso accrescimento e a quadro polmonare d'interstiziopatia (m. di Niemann-Pick tipoB) sono importanti per la diagnosi.
- Le manifestazioni osteo-articolari sono presenti in numerose LSD, ricercare eventuale rigidità articolare o il gibbo dorsolombare (MPS); importante è lo studio RX scheletro (disostosi multipla).

Il sospetto clinico è il punto di partenza per la ricerca di segni clinici meno evidenti e avvio alle corrette indagini strumentali, biochimiche e molecolari. I progressi della biochimica, l'identificazione dei geni coinvolti, lo studio delle neuroimmagini, in particolare della risonanza magnetica (RM), hanno portato all'identificazione di sempre più numerosi pazienti, varianti cliniche e a correlazioni genotipo-fenotipo; le nuove prospettive terapeutiche per alcuni difetti rendono indispensabile una diagnosi precoce.

**Seconda Sessione**

**Nuovi approcci di diagnosi  
delle malattie lisosomiali**

*Moderatori*

Paola Di Natale, Anna Maria Vaccaro



## **PREVENZIONE E DIAGNOSI PRECOCE DELLE MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE: DALLO STUDIO FAMILIARE ALLO SCREENING NEONATALE**

Enrico Zammarchi

*Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Firenze*

Le malattie da accumulo lisosomiali (LSDs) sono un gruppo eterogeneo di circa 40 patologie genetiche ciascuna dovuta al deficit singolo o combinato di proteine lisosomiali, enzimi, cofattori, trasportatori o attivatori. Il deficit totale o parziale di una proteina lisosomiale determina un accumulo intralisosomiale di specifici substrati provenienti da diverse vie metaboliche. È proprio l'accumulo dei substrati non degradati la causa fisiopatologica del danno e morte cellulare. Le LSDs sono state classificate in base al maggiore prodotto di accumulo in Mucopolisaccaridosi, Sfingolipidosi, Glicoproteinosi e altre.

Sebbene ciascuna di queste patologie, considerata singolarmente, presenti una frequenza piuttosto bassa nella popolazione umana, l'incidenza globale è di circa 1:5000 nati rappresentando così una importante parte delle patologie metaboliche.

Le LSDs generalmente colpiscono tutte le fasce di età, prevalentemente quelle pediatriche, con un grave impatto sociale e familiare. I pazienti affetti, generalmente asintomatici alla nascita, possono presentare successivamente manifestazioni cliniche che vanno da un grave coinvolgimento del sistema nervoso centrale ad alterazioni scheletriche che limitano l'autonomia fino a importanti alterazioni di organo con conseguenti frequenti ospedalizzazioni e con morte spesso nella prima adolescenza.

Per alcune di queste patologie sono oggi disponibili trattamenti quali ad esempio il trapianto di midollo o la terapia enzimatica sostitutiva, il cui successo è anche dipendente dalla precocità dell'intervento. Di conseguenza, una possibile diagnosi precoce di queste patologie, potrebbe consentire un intervento terapeutico precoce sui pazienti o quanto meno una più stretta sorveglianza dei soggetti a rischio. La individuazione precoce di tali patologie poggia su alcune possibilità principali e cioè: a) lo studio familiare nei casi con presenza di un probando diagnosticato; b) lo screening mirato su soggetti con manifestazioni cliniche suggestive di patologia lisosomiale; c) lo screening neonatale.

*Studio familiare.* Nelle famiglie con soggetto già diagnosticati una anamnesi accurata, il rilievo di segni obiettivi specifici di certe patologie del gruppo, gli studi biochimici e molecolari possono consentire una completa chiarificazione della situazione familiare con possibilità quindi di un adeguato consiglio genetico e di una diagnosi prenatale ove indicata e richiesta. Non va sottovalutata inoltre la possibilità di trattamento anche in pazienti presintomatici, con l'utilizzo dei trattamenti disponibili sopra ricordati (trapianto di midollo, terapia enzimatica sostitutiva), senza dimenticare gli inibitori della sintesi dei substrati e le molecole chaperoniche.

*Screening mirato su soggetti con manifestazioni cliniche suggestive di patologia lisosomiale.* Attualmente la diagnosi di LSDs è molto complessa, richiede dosaggi multipli su urine, sangue e colture cellulari con tempi di risposta molto lunghi prima di una diagnosi precisa. Il ritardo della diagnosi è anche dovuto alla scarsa conoscenza di queste patologie, data la loro rarità, e al fatto che, in molti casi, la sintomatologia iniziale può essere confusa con altre patologie d'organo più frequenti.

In caso di sintomatologia suggestiva potrebbe molto precocemente essere eseguito uno screening mirato con le metodiche messe a punto da Chamoles per 5-6 patologie per le quali è disponibile già attualmente la terapia. Tali metodiche consistono in dosaggi di alcuni enzimi lisosomiali su spot di sangue con rivelazione fluorimetrica per ogni singolo enzima. Tale metodica ha il vantaggio di permettere l'invio a distanza di campioni di sangue raccolti su carta da filtro analogamente a quanto effettuato per gli screening neonatali classici. Questo tipo di approccio peraltro non consente la identificazione di pazienti in fase presintomatica, ma, se il sospetto è molto precoce, può rendere possibile, semplificando l'iter diagnostico, una altrettanto precoce terapia.

*Screening neonatale.* Eccetto per i rari casi familiari, l'identificazione presintomatica di LSDs può essere ottenuta soltanto con lo screening esteso a tutta la popolazione neonatale.

Marcatori precoci recentemente identificati quali proteine associate alla membrana lisosomiale LAMP-1, LAMP-2 e Saposina C (Sap-C), sono state e sono tentativamente utilizzate per l'identificazione presintomatica di malattia da accumulo in quanto presenti e alterate già nei primi giorni di vita. Circa l'80% dei soggetti affetti potrebbe essere identificato alla nascita con la determinazione delle stesse. Uno screening neonatale pilota su svariate decine di migliaia di soggetti è stato condotto negli ultimi anni in Australia con risultati inizialmente incoraggianti. L'analisi viene condotta mediante la valutazione quantitativa simultanea di 2 diversi anticorpi sulla membrana lisosomiale, anti-LAMP-1 e anti-LAMP-2 e la presenza di anticorpi anti-Sap-C nel plasma dei soggetti esaminati. La tecnica prevede un primo screening della popolazione neonatale da effettuarsi sugli spot dei cartoncini di Guthrie; i soggetti positivi saranno ulteriormente valutati mediante altre metodiche per la conferma del sospetto.

Naturalmente uno screening allargato anche verso patologie attualmente non curabili solleva numerose problematiche dal punto di vista etico.

Tali problematiche e i risultati non completamente soddisfacenti dello screening mediante LAMP-1, LAMP-2 e Sap-C hanno indirizzato alla ricerca di altre strategie di screening e cioè: a) screening enzimatico multiplo secondo la tecnica sopra riportata di Chamoles. In questa maniera è possibile sottoporre a screening solo le patologie per le quali è attualmente disponibile la terapia; b) screening enzimatico non con rivelazione fluorimetrica come nel caso precedente, ma con rivelazione multipla in tandem massa. Anche in questo caso possono essere sottoposte a screening solo le patologie suscettibili di trattamento; c) screening multiplo in tandem massa con ricerca diretta dei metaboliti accumulati. Quest'ultima procedura può permettere di ricercare solo i difetti per i quali è disponibile una terapia e risulta molto meno indaginosa delle forme precedenti in quanto poggia sulla identificazione dei metaboliti patologici dopo una semplice estrazione e derivatizzazione.

*Si ringrazia il Comune di Scandicci (Fi) e il Lions Club di Scandicci per il contributo finanziario alla ricerca sullo screening per le Malattie Lisosomiali.*

## MALATTIA DI GAUCHER: CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO

Mirella Filocamo

*Laboratorio Diagnosi Pre-Postnatale Malattie Metaboliche, Istituto G. Gaslini, Genova*

La malattia di Gaucher (MG), disordine ereditario del metabolismo dei glicosfingolipidi, è trasmessa come carattere autosomico recessivo; è causata dal difetto dell'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi che determina l'accumulo del rispettivo substrato, glucocerebroside, nei lisosomi delle cellule del sistema reticolo-endoteliale.

MG è caratterizzata da un *continuum* di fenotipi clinici che vanno da forme letali perinatali a forme asintomatiche dell'adulto. Convenzionalmente tre fenotipi clinici sono riconosciuti in base all'assenza o presenza ed età di insorgenza del coinvolgimento neurologico (tipo 1, adulto OMIM #230800; tipo 2, acuto infantile OMIM #230900; tipo 3, giovanile OMIM #231000).

La malattia di Gaucher è il primo esempio di malattia da accumulo lisosomiale in cui è stato impiegato con successo la terapia enzimatica sostitutiva (ERT).

*Diagnosi enzimatica.* La diagnosi enzimatica rappresenta il mezzo diagnostico più immediato e affidabile per confermare il sospetto clinico di MG. Essa si basa sulla dimostrazione di una ridotta/assente attività della glucocerebrosidasi (beta-glucosidasi acida) normalmente presente nei lisosomi di una varietà di tessuti: dai leucociti, separati da sangue periferico, alle cellule coltivate (fibroblasti e/o linfoblasti); anche i villi coriali e gli amniociti sono un'ottima fonte enzimatica in diagnosi prenatale, rispettivamente in 12<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> settimana di gravidanza.

I limiti del dosaggio enzimatico sono essenzialmente legati all'impossibilità di correlare l'attività enzimatica residua alla gravità della malattia; il test enzimatico presenta inoltre una scarsa affidabilità nella individuazione dei portatori in quanto non sempre permette di discriminare i portatori dai controlli.

*Diagnosi molecolare.* La diagnosi molecolare, tramite la caratterizzazione degli alleli-malattia, permette l'individuazione dei portatori, nell'ambito delle famiglie con caso indice caratterizzato. Può inoltre facilitare decisioni su possibili programmi terapeutici.

Il gene glucocerebrosidasi, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 1 nella regione q21-p23, è costituito da oltre 7000 paia di basi (pb). È processato in una molecola più corta di mRNA (circa 2000 pb) che viene tradotta nella proteina enzimatica glucocerebrosidasi, costituita da circa 500 aminoacidi. Nella stessa regione genomica è situato uno pseudogene, non funzionale, con un'omologia di sequenza con il gene funzionale di circa il 96%. L'esistenza di una così elevata omologia può complicare l'analisi mutazionale; tuttavia vi sono differenze, nella struttura dei due geni, che permettono lo sviluppo di strategie metodologiche in grado di selezionare le regioni genomiche del gene attivo da quelle dello pseudogene non funzionale.

A parte tre gruppi etnici (Ebrei Ashkenaziti, Arabi di Jenin, e Svedesi Norrbottniani) in cui un esiguo numero di mutazioni nel gene glucocerebrosidasi è responsabile della maggior parte degli alleli malattia, in tutte le altre popolazioni è stata riportata un'ampia eterogeneità molecolare con oltre 200 mutazioni descritte. Questa ampia eterogeneità

allelica rappresenta un grosso limite sia per l'analisi molecolare come strumento diagnostico, poiché, come tale, richiede la caratterizzazione di entrambi gli alleli, che per studi di correlazioni genotipo-fenotipo, che devono essere necessariamente basati su larghe casistiche. Accanto alla vasta eterogeneità molecolare, è stata anche riportata un'enorme variabilità fenotipica. Questo ha spesso vanificato i tentativi di correlare genotipo-fenotipo, per cui gli studi di correlazione hanno sostanzialmente portato a conclusioni pressoché univoche solo per le mutazioni più frequenti. La mutazione p.N370S (c.1226A>G) è stata associata con il Gaucher di tipo 1 in base all'osservazione che nessuno dei pazienti, con almeno un allele p.N370S, presentava coinvolgimento neurologico e che i pazienti, omozigoti per la p.N370S, avevano un quadro clinico da asintomatico a lieve. La presenza di eteroallelismo per la mutazione p.L444P (c.1448T>C) in tutte le forme di Gaucher (tipo 1, 2 e 3) ha portato a concludere, invece, quanto sia determinante il contributo del secondo allele, per l'insorgenza della patologia neurologica. Dallo studio di ampie casistiche è stato suggerito un alto rischio di forma neuronopatica per pazienti omozigoti per la mutazione L444P oppure eterozigoti composti per la p.L444P in associazione con uno dei seguenti alleli: p.D409H (c.1342G>C), p.G202R (c.721G>A), ricombinanti (alleli dovuti a riarrangiamenti tra gene e pseudogene).

Ciononostante, la variabilità, sia interfamiliare che intrafamiliare, osservata in pazienti con lo stesso genotipo, richiede cautela nella predizione della prognosi della malattia. È ormai chiaro che altri fattori, oltre alle mutazioni identificate, contribuiscono all'insorgenza dei differenti fenotipi, osservati nella malattia di Gaucher.

La nostra esperienza è relativa a una casistica costituita da 175 pazienti, non imparentati. A parte 6 pazienti, i rimanenti 169 hanno origine italiana. L'analisi di mutazione (350 alleli) ha permesso di caratterizzare 337 alleli malattia (96,3%), dovuti a 47 diverse mutazioni. La prevalenza delle mutazioni è risultata pressoché sovrapponibile a quella della popolazione europea. Le mutazioni più frequenti, p.N370S e p.L444P, sono responsabili del 63,8% degli alleli malattia (36,9% e 26,9%, rispettivamente). La terza mutazione più frequente è la p.G202R, con una frequenza del 3,4%; la p.D409H è stata trovata sia come unica mutazione, nell'1% degli alleli, che in associazione con una seconda mutazione *in cis*, nell'1,7% degli alleli [p.D409H; p.H255Q]. Il gruppo degli alleli ricombinanti (RecNciI, Delta55, RecI, Rec-ex6; Rec-ex7) è responsabile del 4,4%. Il 3,7% degli alleli è ancora sconosciuto mentre i rimanenti alleli sono dovuti a mutazioni rare o nuove.

## ALTERAZIONI NEL CATABOLISMO DEGLI SFINGOLIPIDI NELLE SFINGOLIPIDOSI

Rosa Salvioli

*Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Gli sfingolipidi sono componenti delle membrane plasmatiche delle cellule eucariotiche. Sono tipiche sostanze anfifiliche caratterizzate da una porzione idrofobica e una porzione idrofilica. La struttura base degli sfingolipidi è il ceramide, da cui si originano i fosfosfingolipidi e i glicosfingolipidi. Una volta sintetizzati, gli sfingolipidi raggiungono la membrana plasmatica. In passato si pensava che questi composti fossero semplici componenti strutturali delle membrane, oggi sono riconosciuti come regolatori di una moltitudine di processi cellulari. Infatti alcune porzioni di membrana, ricche di diversi sfingolipidi, colesterolo e/o proteine, definite *lipid rafts*, hanno la funzione non solo di trasporto dei lipidi all'interno della cellula, ma anche di segnale (*signaling*) in processi di riconoscimento cellula-cellula, cellula-substrato, cellula-agente patogeno. Hanno inoltre un ruolo importante nella proliferazione e nella differenziazione cellulare e nell'apoptosi. Date le loro molteplici funzioni cellulari specifici sfingolipidi vengono sintetizzati in differenti tipi cellulari in relazione allo stadio di sviluppo e alla funzione della cellula. In condizioni normali sintesi e catabolismo degli sfingolipidi sono in equilibrio. La sintesi avviene nel reticolo endoplasmatico e le modificazioni post-traduzionali nell'apparato del Golgi. Non si conoscono finora malattie genetiche dovute a difetti nella sintesi degli sfingolipidi, mentre sono state identificate varie patologie derivanti da alterazioni nel loro catabolismo, che vanno sotto il nome di sfingolipidosi. Il catabolismo degli sfingolipidi avviene nel compartimento acido delle cellule, gli endosomi e i lisosomi. Frammenti della membrana plasmatica, contenenti sfingolipidi destinati alla degradazione, si invaginano e, sotto forma di vescicole, attraversano il comparto endosomiale raggiungendo i lisosomi dove vengono internalizzati nel *lumen*. Queste vescicole intralisosomiali sono il luogo dove avviene la degradazione degli sfingolipidi ad opera di diversi enzimi che hanno la capacità di idrolizzare sequenzialmente gli zuccheri dalla parte non riducente del glicolipide.

Gli sfingolipidi a catena glicidica corta (da uno a quattro residui), presenti sulle membrane intralisosomiali, non sono sufficientemente accessibili alle idrolasi, e per questo richiedono la presenza di attivatori proteici per la loro degradazione. Sono noti due tipi di attivatori: quattro saposine (Sap A, Sap B, Sap C e Sap D), che derivano da un comune precursore, la prosaposina, e il GM<sub>2</sub> attivatore. Le saposine hanno differente specificità *in vivo*: la Sap A favorisce la degradazione del galattosilceramide, la Sap B stimola la degradazione del solfatide, la Sap C quella del glucosilceramide e infine la Sap D quella del ceramide. La completa mancanza del loro precursore, la prosaposina, è causa di una patologia devastante (*Prosaposin deficiency*) che porta a morte entro le prime settimane di vita. Analizzando i fibroblasti provenienti da un paziente affetto da questa malattia abbiamo riscontrato l'accumulo simultaneo di svariati sfingolipidi, in particolare lattosilceramide, glucosilceramide e ceramide. In letteratura sono riportati solo pochissimi casi di questa

grave sfingolipidosi, in cui una mutazione nel gene della prosaposina comporta la mancanza delle quattro saposine.

La maggior parte delle sfingolipidosi sono comunque dovute a mancanza di attività di specifiche idrolasi lisosomiali. L'accumulo intracellulare di un determinato sfingolipide interferisce con il traffico lipidico e può generare l'accumulo secondario di colesterolo. L'entità dell'accumulo di un particolare sfingolipide è in genere correlata all'attività residua dell'enzima corrispondente che per altro è molto variabile tra i pazienti.

Alcune sfingolipidosi coinvolgono principalmente il sistema nervoso, come la malattia di Krabbe, dovuta alla mancanza di galattosilceramidasi che, in presenza di Sap A, idrolizza il galattosilceramide, principale costituente delle membrane delle cellule nervose. Una delle caratteristica di questa patologia è l'accumulo della galattosilsfingosina, metabolita altamente citotossico che provoca la distruzione degli oligodendrociti, cellule che formano la mielina.

Altre sfingolipidosi coinvolgono sia il sistema nervoso che quello viscerale. Un esempio è la malattia di Gaucher (MG), causata da mutazioni o nel gene della glucosilceramidasi o in quello della Sap C con conseguente accumulo di glucosilceramide nelle cellule del sistema del reticolo endoteliale. Questa patologia è stata da noi a lungo studiata. Abbiamo infatti dimostrato che la degradazione del glucosilceramide richiede non solo la presenza dell'enzima glucosilceramidasi ma anche del suo attivatore proteico, la Sap C, e di fosfolipidi acidi. Abbiamo poi studiato le proprietà funzionali della glucosilceramidasi e la sua interazione con la Sap C per chiarire a quale livello il processo di degradazione viene alterato dalle mutazioni enzimatiche. Abbiamo anche analizzato i prodotti di accumulo sia in fibroblasti provenienti da pazienti affetti da MG sia in un modello cellulare, costituito da fibroblasti di controllo coltivati in presenza di conduritolo- $\beta$ -eossido (CBE), inibitore irreversibile della glucosilceramidasi.

In conclusione lo scopo delle nostre ricerche sulle sfingolipidosi è la comprensione del ruolo dei vari fattori che intervengono nel catabolismo degli sfingolipidi (idrolasi, attivatori, ecc.) al fine di mettere a punto metodi di diagnosi e terapia sempre più specifici ed efficaci.

**Terza Sessione**

**Aggiornamento sugli interventi terapeutici  
per le malattie lisosomiali**

*Moderatori*

Carlo Dionisi-Vici, Enrico Zammarchi



## TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA PER LA MALATTIA DI FABRY

Roberta Ricci, Mario Castorina, Daniela Antuzzi  
*Dipartimento di Scienze Pediatriche Medico-chirurgiche e di Neuroscienze dello Sviluppo,  
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma*

La malattia di Anderson-Fabry è una grave malattia multisistemica del metabolismo degli sfingolipidi, determinata dalla deficienza dell'enzima lisosomiale Alpha galattosidasi A e trasmessa come carattere X-linked. La sua incidenza è stimata di 1:40.000-1:117.000 di maschi nati vivi.

La mancanza della attività dell'enzima determina un progressivo accumulo degli sfingolipidi neutri nei lisosomi delle cellule endoteliali, dei cardiomiociti, delle cellule del derma. Il danno cellulare si riflette sulla funzione degli organi e, negli affetti, determina insufficienza renale, cardiomiopatia ipertrofica, angiocheratoma, acroparestesie, anidrosi, alterazioni del sistema nervoso autonomo e centrale. La malattia di Fabry non era suscettibile di una terapia eziologica ma si limitava a terapie sintomatiche; nel 2001 è stata introdotta la terapia enzimatica sostitutiva (ERT) mediante somministrazione esogena dell'enzima, rappresentando quindi un trattamento specifico .

I pazienti sono stati reclutati da database FOS (Fabry Outcome Survey) con il contributo di undici nazioni europee e riguardano le osservazioni cliniche e laboratoristiche dei soggetti in ERT, (agalsidase alpha, 0,2 mg/kg in 40 minuti, ogni due settimane).

Il follow up è stato fatto ogni tre mesi nel primo anno di trattamento, e successivamente ogni sei mesi. Il danno renale è stato classificato secondo i criteri sviluppati dal Kidney Disease Outcome Quality Initiative (KDOQI). La velocità di filtrazione glomerulare (GFR) è stata calcolata secondo la formula del MDRD Modification of Diet in Renal Disease.

La massa del ventricolo sinistro è stata valutata secondo M-mode ecocardiografia . L'ipertrofia del ventricolo sinistro (LHV) è definita come un LVM rapportato alla altezza maggiore di 50. Il dolore è valutato applicando il Brief Inventory Pain (BPI) per il quale i pazienti hanno compilato autonomamente un questionario, senza interferenze del medico e del personale sanitario.

La qualità della vita è valutata mediante l'European Quality of Life Questionnaire Euro-Qol, EQ-5D). Il questionario copre cinque dimensioni (movimento, dolore/disagio, ansietà/depressione, autogestione e le attività usuali; le risposte hanno tre livelli: senza problemi, alcuni problemi e problemi molto seri.

I risultati riguardano una coorte di 800 pazienti .

La durata del trattamento è di quattro anni, i dati di questo lavoro riguardano le analisi statistiche di pazienti in trattamento da tre anni.

Il danno renale espresso come velocità della filtrazione glomerulare (GFR) inferiore a 90/ml min<sup>-1</sup>1.73 m<sup>-2</sup> o da proteinuria era presente nell'84% della coorte dei pazienti esaminati. I dati longitudinali erano disponibili per il 55% di questi. I valori della GFR si mantengono stabili sia nei pazienti con una GFR alla baseline compresa tra i 60-90/ ml min<sup>-1</sup>1.73 m<sup>-2</sup> come in quelli con i valori compresi tra i 30-60/ ml min<sup>-1</sup>1.73 m<sup>-2</sup>. Tre pazienti con una GFR compresa tra 20-30/ml min<sup>-1</sup>1.73 m<sup>-2</sup>, la GFR in uno è rimasta invariata, e negli altri due diminuita.

La cardiomiopatia ipertrofica, è stata valutata prima dell'inizio del trattamento con ERT e dopo 1 e 2 e 3 anni nei pazienti che presentano uno spessore del ventricolo sinistro (MWT >11 mm) e la massa del ventricolo sinistro (LVM > 50g). Si osserva una significativa riduzione dello spessore della parete del ventricolo sinistro ( $P<0,05$ ) e similmente della massa cardiaca ( $P<0,05$ ).

La riduzione del dolore viene riferita da tutti i pazienti fin dall'inizio della terapia; la somministrazione dei questionari, longitudinalmente, BPI e del QoL hanno confermato la riduzione del dolore espresso come “dolore dalla durata media”, e “dolore adesso” ( $P<0,05$ ). Contemporaneamente si è osservato un miglioramento significativo della qualità della vita misurato quale migliorata l'abilità nella deambulazione, l'attività generale quotidiana l'attività lavorativa e le relazioni sociali.

Solo il 12% dei pazienti ha riportato effetti collaterali riferibili all'infusione, con una incidenza di circa lo 0,7%. Le reazioni sono generalmente lievi, caratterizzate da febbre, malessere o rash cutanei, e rispondevano alla sospensione temporanea dell'infusione o alla somministrazione di antistaminici. Importanti eventi avversi si sono verificati il 38 pazienti- 11 femmine (10%) e 27 maschi (15%), ma nessuno legato al trattamento, ma piuttosto alla progressione della malattia.

I dati presentati stanno ad indicare l'efficacia del trattamento della ERT nella malattia di Fabry. Sono stati presi in esame gli organi che sono maggiormente colpiti dalla malattia: rene e cuore, e disturbi funzionali condizionanti le normali attitudini di vita (dolore e la qualità della vita).

I risultati su altre manifestazioni della malattia, quali l'angiocheratoma, la cornea verticillata, sono in corso di valutazione.

I risultati presentati mostrano come la ERT ha un effetto significativo nella stabilizzazione della funzionalità renale espressa come GFR nei pazienti con lieve e moderata insufficienza renale. Questo dato è clinicamente molto importante perché sembra arrestare il declino naturale che si osserva nei pazienti non trattati e che si stima essere di  $12 \text{ ml min}^{-1} \text{ anno}^{-1}$ . Nei pazienti con danno renale conclamato, la terapia sembra inefficace, infatti si osserva il progredire di lesioni istologiche, incluse la fibrosi e la sclerosi glomerulare.

La valutazione ecocardiografica insieme all'elettrocardiogramma sono risultati essere un buon metodo per valutare l'ipertrofia del ventricolo sinistro, caratteristico della malattia di Fabry. Queste indagini hanno mostrato una significativa riduzione del LVH e MWT dopo il primo anno di ERT e in minor misura dopo il secondo anno.

Anche il dolore si riduce con la ERT, infatti vi è un aumento del valori nella scala del questionario BPI sia nel primo che nel secondo anno.

Associato alla riduzione del dolore si osserva un miglioramento della qualità della vita.

## MODELLI DI TERAPIA CELLULARE ED ENZIMATICA PER LE MUCOPOLISACCARIDOSI

Maurizio Scarpa

*Centro Regionale Malattie Rare, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova*

Le patologie da accumulo lisosomiale comprendono un gruppo di più di trenta diverse malattie ereditarie dovute alla mancanza di una proteina lisosomiale che è parte di un processo catabolico.

Le proteine mancanti sono idrolasi o cofattori coinvolti nella degradazione di macromolecole che rilasciano prodotti catabolici nel citosol. Le patologie da accumulo lisosomiale sono classificate in base al meccanismo coinvolto e alla natura dei substrati accumulati. Sono noti dieci difetti di degradazione dei mucopolisaccaridi, cinque delle glicoproteine, otto degli sfingolipidi e uno che determina accumulo intralisosomiale del glicogeno (glicogenosi).

Le mucopolisaccaridosi sono una famiglia di malattie dovute alla mancanza di uno dei 10 enzimi lisosomiali implicati nel catabolismo del dermatan, eparan e cheratan solfato. L'incompleta degradazione di questi glicosaminoglicani (GAG) dovuta all'assenza anche di un singolo enzima comporta accumulo progressivo di materiale non degradato nei lisosomi provocando dapprima sofferenza e, successivamente, morte cellulare. Dal momento che i lisosomi sono contenuti in tutte le cellule dell'organismo, fatta eccezione per i globuli rossi, il difetto metabolico si verifica contemporaneamente a carico di vari organi e apparati. Le manifestazioni cliniche che caratterizzano le diverse MPS sono essenzialmente correlate alla quantità e al tipo di sostanza accumulata, da cui in genere prende origine la denominazione delle malattie.

Dal punto di vista clinico le MPS sono disordini multiorgano, caratterizzati dalla presenza di epatosplenomegalia, disostosi multipla, cardiopatie, alterazioni respiratorie secondarie ad alterazioni scheletriche, sordità, alterazioni oculari e spesso ritardo mentale. Tali segni sono spesso sfumati nei primi due anni di vita, rallentando la diagnosi e compromettendo l'efficacia di una eventuale terapia. Fino a poco tempo fa, l'unica forma di trattamento per le MPS era il trapianto di Midollo Osseo, applicabile solo ad alcune forme di malattia (MPSI e MPSVI). Da qualche anno, la sintesi di enzimi ricombinanti e la loro somministrazione (*Enzyme Replacement Therapy*, ERT) ha aperto nuovi orizzonti per il trattamento di tali patologie. Attualmente sono in corso studi per l'ERT in corso di MPS tipo I, II e VI. In tutti gli studi si dimostra una sostanziale modificazione del fenotipo della malattia con correzione o drastica riduzione di GAG urinari, una normalizzazione dell'epatosplenomegalia e un miglioramento della mobilità articolare, in assenza di effetti collaterali importanti. In tutti i pazienti si è osservata una risposta anticorpale specifica contro la proteina ricombinante che tuttavia non annulla gli effetti terapeutici essendo anticorpi non neutralizzanti. Un aspetto da considerare è il costo di tale terapia.

Si è stimato che sottoporre a ERT un paziente di circa 30 kg richieda un impegno di spesa di circa € 300.000 annue. A tale scopo abbiamo valutato una possibile terapia alternativa basata sul principio della terapia enzimatica sostitutiva endogena, ossia la

correzione fenotipica della malattia mediante impianti di capsule contenenti cellule ingegnerizzate overproducenti l'enzima difettivo.

Dopo circa 2 mesi dall'impianto si è notata la correzione fenotipica della malattia in animali modello. Comunque le MPS rimangono delle malattie per le quali è necessario un team assistenziale multidisciplinare che possa assicurare al paziente un follow up adeguato.

Non da ultimo è fondamentale un coordinamento con le Associazioni di pazienti per supportare anche psicologicamente la famiglia e ottimizzare il contesto sociale nel quale il paziente vive.

## TERAPIA GENICA PER LA MUCOPOLISACCARIDOSI DI TIPO I E DI TIPO IIIB IN MODELLI MURINI

Carmela Di Domenico, Paola Di Natale

*Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli*

La mucopolisaccaridosi di tipo I (MPS I) e la mucopolisaccaridosi di tipo IIIB (MPS IIIB) sono malattie da accumulo lisosomiale dovute a mutazioni nei geni dell' $\alpha$ -L-iduronidasi (IDUA) e dell' $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasi (NAGLU), rispettivamente. Entrambi i disordini sono caratterizzati da alterazioni diffuse in diversi organi e apparati. Per quanto riguarda la MPS IIIB non c'è attualmente nessuna terapia. I trattamenti disponibili per la MPS I invece, comprendono il trapianto di midollo osseo (BMT) e la terapia enzimatica sostitutiva (ERT). Entrambi i trattamenti hanno dato buoni risultati, tuttavia hanno anche dimostrato dei limiti: il BMT risulta un trattamento efficace solo nei casi in cui è effettuato nelle fasi iniziali della malattia; inoltre sussiste il problema della mancanza dei donatori e della possibile incompatibilità. La ERT è ancora oggi costosa e i pazienti devono essere sottoposti a iniezioni settimanali. Di qui la necessità di sperimentare nuovi approcci terapeutici come la terapia genica.

Noi abbiamo rivolto la nostra attenzione ai vettori lentivirali come agenti di trasfezione genica. Il vettore lentivirale contenente il cDNA per IDUA o NAGLU è prodotto mediante cotrasfezione di cellule 293T con quattro differenti costrutti: pMDLg/pRRE, che è un costrutto di *packaging* attenuato contenente la sequenza RRE e codificante per i geni gag e pol di HIV-1; pRSV-Rev, che è un costrutto che esprime la proteina Rev; pMD2.G, che produce la proteina G del virus della stomatite vescicolare; e pRRLsinPPT.CMV.IDUA/NAGLU.WPRE che contiene il cDNA da trasferire. In questo ultimo costrutto, autoinattivante (sin), PPT comprende un tratto polipurinico e le sequenze di terminazione del gene pol dell'HIV-1 che incrementano la traslocazione nucleare; WPRE è un elemento regolatore post-trascrizionale del virus dell'epatite di picchio. Le particelle virali ottenute dal mezzo condizionato delle 293T vengono concentrate mediante ultracentrifugazione e quantizzate mediante un test ELISA specifico per la proteina virale p24. Abbiamo dimostrato l'efficacia di tali vettori *in vitro*, in fibroblasti di pazienti MPS I e MPS IIIB. Recentemente abbiamo effettuato uno studio preclinico di terapia genica sui modelli murini della MPS I e della MPS IIIB. In questo studio sono stati utilizzati topi "knock-out" di 8-10 settimane trattati con dosi crescenti di vettore lentivirale (2, 10, 15  $\mu$ g di proteina virale p24) mediante iniezioni nella vena caudale. Gli animali sono stati sacrificati un mese o sei mesi dopo il trattamento.

I dati ottenuti per la MPS I suggeriscono che un mese dopo la somministrazione di una singola dose di vettore l'attività enzimatica risulta aumentata in tutti gli organi degli animali trattati, raggiungendo valori più alti nel fegato e nella milza. L'attività nel fegato corrisponde allo 0,77% del valore trovato nei tessuti dei topi normali, mentre l'attività nella milza corrisponde all'1% del valore trovato nei topi normali. Sebbene modesta, l'attività enzimatica ripristinata è sufficiente a normalizzare l'accumulo dei glicosaminoglicani (GAGs) nelle urine, nel fegato e nella milza, e a ridurre il livello dei GAGs in rene, cuore e polmone. Esperimenti di PCR evidenziano l'integrazione del DNA trasdotto dal vettore

solo nel fegato e nella milza dei topi trattati, suggerendo che la correzione della patologia negli altri organi è dovuta alla secrezione dell'enzima ricombinante nel plasma e successivo *uptake* nei tessuti periferici. Anticorpi verso l'enzima ricombinante umano sono stati evidenziati nel siero dei topi un mese dopo il trattamento; tuttavia questi anticorpi non sopprimono l'effetto terapeutico del vettore (riduzione dell'accumulo dei GAGs). Il follow-up della terapia dopo sei mesi dal trattamento mostra che l'attività enzimatica nel fegato e nella milza dei topi trattati è praticamente nulla, il livello dei GAGs è elevato, e il livello degli anticorpi risulta aumentato di 23 volte rispetto al valore trovato nel topo non trattato. Invece gli esperimenti mediante PCR mostrano che il vettore è ancora integrato dopo sei mesi, sebbene con un numero di copie ridotto. Abbiamo ipotizzato che la perdita di espressione del transgene nel tempo sia dovuta ad una *clearance* delle cellule trasdotte causata da una forte risposta immunitaria contro il transgene.

I dati ottenuti nel modello murino della MPS IIIB un mese dopo il trattamento indicano che dopo una singola iniezione di vettore lentivirale l'attività enzimatica risulta aumentata in fegato, milza, polmone e cuore, con livelli più alti nel fegato e nella milza. I valori trovati in questi organi rappresentano l'1% e il 27,7% rispettivamente del valore trovato nel controllo normale. L'attività enzimatica ripristinata induce una marcata riduzione dell'accumulo dei GAGs: dal 77% di riduzione nel fegato, al 29% nel polmone. Esperimenti di PCR evidenziano la presenza del DNA trasdotto dal vettore in fegato, milza e polmone degli animali trattati, con un numero di copie di vettore maggiore nel fegato rispetto alla milza. Esperimenti di immunistoichimica confermano la presenza dell'enzima ricombinante nel fegato degli animali trattati. Sei mesi dopo il trattamento, a differenza di quanto evidenziato nel modello murino della MPS I, il livello dei GAGs si mantiene ancora ridotto in fegato, milza, cuore e polmone, e il livello degli anticorpi nel siero dei topi trattati è basso, simile al livello ottenuto un mese dopo il trattamento. Il DNA trasdotto dal vettore risulta ancora integrato nei tessuti target sebbene il numero di copie di vettore sia ridotto.

In conclusione i vettori lentivirali sembrano essere un buon approccio per la terapia genica di queste due malattie, sebbene ulteriori studi devono essere fatti per migliorare alcuni aspetti.

## MUCOPOLISACCARIDOSI DI TIPO II. MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI TERAPIA GENICA

Maria Pia Cosma

*TIGEM, Telethon Institute of Genetics and Medicine, Napoli*

Le solfatasi sono enzimi che idrolizzano esteri solfato da un'ampia gamma di substrati come glicosaminoglicani, sulfolipidi, e idrossisteroidi. All'interno del reticolo endoplasmatico, le solfatasi sono sottoposte ad una comune e unica modifica post-traduzionale che converte un residuo di cisteina, conservato in tutte le solfatasi e localizzato nel sito catalitico, in alfa-formilglicina.

Ad oggi, nell'uomo, sono state identificate tredici solfatasi. Esse codificano per enzimi con differente specificità di substrato e localizzazione subcellulare come nei lisosomi, Golgi e reticolo endoplasmatico. Le solfatasi sono una famiglia di enzimi molto importante nel metabolismo dell'uomo e infatti esistono ben otto malattie monogeniche dovute al deficit di singole solfatasi. Molte sono malattie da accumulo lisosomiale in cui le conseguenze fenotipiche derivano dal tipo e dalla distribuzione tissutale del materiale accumulato. Tra queste si annoverano: cinque tipi differenti di mucopolisaccaridosi (MPS II, IIIA, IIID, IVA e VI), la leucodistrofia metacromatica (MLD), l'ittiosi legata all'X, e la condrodisplasia puntata.

In un'interessante malattia monogenica umana, il deficit multiplo di solfatasi (MSD), le attività di tutte le solfatasi sono simultaneamente compromesse con livelli variabili di attività residua. La modifica post-traduzionale da cisteina a formilglicina che è richiesta per l'attività delle solfatasi è difettiva nelle linee cellulari dei pazienti MSD. Recentemente, abbiamo identificato il gene che causa l'MSD mediante complementazione funzionale usando il trasferimento cromosomico mediato da microcellule. Lo stesso gene è stato identificato indipendentemente attraverso purificazione della proteina e saggi biochimici da un altro gruppo. Questo gene, chiamato SUMF1 (Sulfatase Modifying Factor 1) è risultato mutato in ogni paziente MSD analizzato. Un notevole incremento nell'attività delle solfatasi si osserva in cellule che overesprimono il cDNA di SUMF1 con i cDNA di differenti solfatasi (ARSA, ARSC, ARSE, GALNS e IDS) rispetto a cellule overesprimenti le solfatasi da sole, indicando che SUMF1 è un fattore limitante per l'attività delle solfatasi.

L'effetto sinergico di SUMF1 con le solfatasi è tempo-dipendente e saturabile. Inoltre, è stata osservata variabilità tra le differenti solfatasi, possibilmente correlata ad una differente affinità della proteina codificata da SUMF1 per le varie solfatasi. Questo potrebbe avere un'importante implicazione medica, poiché tessuti con livelli bassi del gene SUMF1 potrebbero essere meno capaci di modificare solfatasi overesprese.

Questi dati hanno una profonda implicazione per la produzione di massa di solfatasi attive da utilizzare nella terapia enzimatica sostitutiva. Studi di terapia enzimatica sono stati riportati su modelli animali di deficit di solfatasi, come nel caso del modello felino di mucopolisaccaridosi VI, e risultano nella prevenzione e riduzione di alcuni sintomi. Prove terapeutiche nell'uomo sono al momento in corso per malattie congenite date da deficit di solfatasi, MPSII (Sindrome di Hunter) e MPSVI (Sindrome di Moroteaux-Lamy) e saranno presto estese ad un grande numero di pazienti. È evidente che SUMF1 potrebbe

rappresentare uno strumento importante per aumentare l'efficacia della terapia genica nei deficit di solfatasi.

Un approccio terapeutico alternativo è dato dal trasferimento genico di singole solfatasi in modelli murini. In teoria, il trasferimento genico combinato di SUMF1 e di una solfatasi potrebbe incrementare in modo cospicuo l'attività e il recupero fenotipico in queste malattie. In particolare, stiamo effettuando esperimenti di terapia genica nel modello murino per la malattia di Hunter o MPSII, un disordine di accumulo lisosomiale dovuto al deficit della iduronato solfatasi (IDS). Il modello murino della malattia di Hunter include molte delle caratteristiche fenotipiche dell'MPSII, quali le anomalie scheletriche, la facies del muso schiacciata, l'elevato accumulo di glicosamminoglicani (GAGs) nelle urine e in molti organi. Il trattamento dei pazienti Hunter è la terapia enzimatica sostitutiva anche se al momento non è particolarmente efficace. Per questo motivo la terapia genica costituisce un approccio attraente per curare l'MPSII. Abbiamo clonato il gene IDS umano sotto il controllo di un promotore specificamente espresso nel fegato (TBG, Thyroxine-Binding Globulin). Vettori adenoassociati con sierotipo 2/8 (AAV2/8) sono stati generati. Le particelle virali sono state somministrate attraverso la vena della coda in animali adulti del modello murino MPSII (a due mesi di vita). I livelli enzimatici dell'IDS nel plasma sono stati monitorati ogni settimana fino al sacrificio degli animali avvenuto due mesi dopo l'iniezione. L'attività enzimatica risultava molto elevata in tutti gli animali trattati. A due mesi dalla trasduzione, gli animali sono stati sacrificati e tutti gli organi analizzati. L'attività enzimatica dell'IDS risultava completamente corretta con una contemporanea clearance degli accumuli di GAGs tissutali e urinari. Inoltre l'analisi istopatologica rivelava una marcata riduzione della vacuolizzazione cellulare in tutti gli organi esaminati. Abbiamo inoltre effettuato tests comportamentali (*walking pattern, open field activity and Morris water maze*), e gli animali trattati dimostravano un'attività motoria paragonabile al gruppo controllo degli animali sani. Gli stessi esperimenti sono stati effettuati su animali sacrificati 6 mesi dopo la trasduzione. È stato possibile apprezzare una completa correzione del fenotipo anche negli animali trattati a lungo termine che riportavano anche una correzione delle anomalie scheletriche.

Abbiamo inoltre studiato il sistema nervoso centrale del modello murino MPSII. Gli animali presentano un difetto cerebellare consistente nella degenerazione delle cellule del Purkinje e un accumulo di GAGs nei plessi coroidei. Per correggere questi difetti sono in corso esperimenti di somministrazione di vettori virali recanti il gene dell'IDS attraverso iniezione intracisterna nel fluido cerebrospinale.

In conclusione i risultati da noi ottenuti dimostrano l'efficacia di una terapia mediata da vettori adenoassociati per il trattamento della MPSII. Questo lascia intravedere la possibilità di estendere questo tipo di terapia anche agli altri deficit di solfatasi.

## LA RIDUZIONE FARMACOLOGICA DEL SUBSTRATO NELLE SFINGOLIPIDOSI: UNA NUOVA POSSIBILITÀ TERAPEUTICA

Bruno Bembi

*Unità Malattie Metaboliche, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste*

Le malattie ereditarie del metabolismo di glicosfingolipidi (GSL) sono un gruppo di malattie relativamente rare con fenotipi diversi e spesso neurodegenerativi. Generalmente, una deficienza dell'attività enzimatica catabolica causa l'accumulo lisosomiale di substrati GSL e di altri gliconiugati in molte malattie.

Un nuovo approccio per il trattamento di queste patologie è stato denominato "terapia di riduzione del substrato" (SRT) e si basa sull'inibizione dell'enzima principale coinvolto nella biosintesi dei GSL, ceramide glucosiltransferasi. La ridotta biosintesi del glucosilceramide potrebbe correggere lo squilibrio tra la formazione e la degradazione di glicosfingolipidi; l'effetto terapeutico della riduzione del substrato dipende dalla presenza di attività residua in grado di idrolizzare gli glicosfingolipidi accumulati. L'N-butildeossinogirimicina (NB-DNJ) (miglustat, OGT 918) offre un approccio alternativo per il trattamento della malattia di Gaucher mediante terapia di riduzione del substrato.

I trial clinici con miglustat hanno dimostrato un miglioramento delle caratteristiche principali della malattia di Gaucher tipo 1 dopo il primo anno di trattamento, con particolare riferimento ai volumi di fegato e milza, alle variabili ematologiche e alle attività di chitotriosidasi plasmatici. Un ulteriore studio volto alla continuazione della terapia ha dimostrato che i volumi di fegato e milza continuano a diminuire durante il secondo e terzo anno di studio nonostante i cambiamenti nei dosaggi, e anche i parametri ematologici migliorano. Questo studio ha inoltre dimostrato l'efficacia e la sicurezza del miglustat dopo 36 mesi di trattamento. Gli eventi avversi più frequenti osservati durante il trattamento sono stati di tipo gastrointestinale e perdita di peso che si sono manifestati nell'80% e 60% dei pazienti rispettivamente. La maggior parte degli effetti gastrointestinali sono in forma lieve e ci si aspetta si risolvano spontaneamente o in seguito alla riduzione della dose.

Alla fine del 2002, l'EMA ha rilasciato l'autorizzazione all'immissione in commercio, valida per tutta l'Unione Europea, per il medicinale Zavesca, contenente miglustat. L'indicazione approvata è per il trattamento orale della malattia di Gaucher di tipo I con presentazione clinica da leggera a moderata. Lo Zavesca può essere usato solo per il trattamento di pazienti per i quali non è adatta la terapia enzimatica sostitutiva (ERT). Fra i motivi per cui certi pazienti non vogliono sottoporsi alla ERT si evidenzia il problema delle infusioni endovenose regolari, l'accesso venoso, l'agofobia, motivi religiosi. La severità leggera o moderata della malattia di Gaucher è stabilita arbitrariamente in base a criteri clinici e parametri di laboratorio che prevedono un valore di emoglobina superiore a 9 g/dl, piastrine superiori a  $50 \times 10^9/L$  e nessuna evidenza di malattia ossea progressiva. Tuttavia, la terapia con Zavesca dovrebbe essere in tutti i casi prescritta da medici specializzati nella cura della malattia di Gaucher.

In fine, la SRT ha un potenziale terapeutico nel trattamento di altre glicosfingolipidosi oltre alla malattia di Gaucher, e potrebbe risultare efficace nel trattamento di alcune patologie da accumulo neurodegenerative che attualmente sono prive di terapia. Attualmente si attendono con estremo interesse e curiosità i risultati dei trial clinici con miglustat nelle malattie di Gaucher tipo 3, Niemann-Pick tipo C e gangliosidosi GM2 .

## CELLULE STAMINALI E GM2 GANGLIOSIDOSI

Sabata Martino, Aldo Orlacchio

*Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Perugia*

A tutt'oggi non esistono terapie per le malattie genetiche da accumulo metabolico lisosomiale con coinvolgimento neurologico. Noi abbiamo selezionato le GM2 gangliosidosi come modello di studio e avviato lo sviluppo di strategie terapeutiche in cui sono combinate le potenzialità della terapia genica e della terapia cellulare basata sull'uso delle cellule staminali.

Le GM2 gangliosidosi comprendono la malattia di Tay-Sachs (TS) o Variante B, la malattia di Sandhoff o Variante O, causate dalla mancanza dell'enzima lisosomiale beta-Esosaminidasi; e la Variante AB, causata dall'assenza della proteina Attivatore Proteico del ganglioside GM2, la cui importanza è fondamentale nel meccanismo di idrolisi del ganglioside GM2 da parte dell'isoenzima della Esosaminidasi, Esosaminidasi A.

La malattia di Tay-Sachs è causata dalla mancanza di Esosaminidasi A (mutazioni nel gene HEXA) mentre quella di Sandhoff è causata dalla mancanza di entrambi gli isoenzimi Esosaminidasi A e Esosaminidasi B (mutazione nel gene HEXB). In entrambe le malattie, la mancanza degli isoenzimi ha come conseguenza l'accumulo di glicoproteine, proteoglicani e glicosaminoglicani in particolare nel sistema nervoso centrale. Il ganglioside GM2 rappresenta a tale proposito uno dei principali prodotti di accumulo nei lisosomi neurali. La conseguenza di queste alterazioni metaboliche è la degenerazione selettiva delle cellule neurali seguita da morte precoce del paziente nelle forme infantili più gravi.

La difficoltà di raggiungere con farmaci (gene sano, proteina mancante) il SNC, gli aspetti ancora poco chiariti della patofisiologia delle malattie in oggetto, nonché l'assenza di diagnosi sicure sono le principali cause per l'assenza di terapie efficaci per queste patologie.

Noi riteniamo che la combinazione fra terapia genica (introduzione del gene sano) e terapia cellulare (uso di cellule staminali) permettano il ripristino del difetto metabolico e la riparazione del danno tessutale.

Fasi obbligate per la terapia di malattie da accumulo metabolico sono; 1- produzione *in situ* dell'enzima mancante e controllo della sua corretta attività catalitica; 2- efficacia della cross-correction; 3- distribuzione dell'enzima nel SNC.

A tale scopo abbiamo ingegnerizzato le cellule di paziente con la malattia di TS *in vitro* con un vettore retrovirale contenente il cDNA HEXA che codifica per la subunità  $\alpha$  della Esosaminidasi. In queste condizioni sperimentali siamo riusciti a rimuovere il difetto metabolico. L'attività della Esosaminidasi A risultava completamente ripristinata e il catabolismo del ganglioside GM2 ristabilito. Al contrario, la somministrazione di Esosaminidasi A ricombinate, prodotta per over espressione con lo stesso vettore in fibroblasti umani normali non riusciva a rimuovere l'accumulo metabolico suggerendo una probabile alterazione del meccanismo di cross-correzione in questi pazienti.

Tuttavia, questo problema non ha ostacolato l'efficacia della terapia genica *in vivo*. Per questo approccio preclinico, abbiamo combinato le proprietà dei vettori erpetici non replicanti con le caratteristiche anatomiche di alcune regioni del cervello. Topi con la malattia di TS sono stati inoculati con un vettore erpetico contenente il cDNA HEXA nella regione della capsula interna dell'emisfero sinistro del cervello. Questo tipo di approccio si è dimostrato veramente efficace: l'attività enzimatica della Esosaminidasi A è risultata completamente ristabilita e l'accumulo del ganglioside GM2 completamente rimosso dopo un solo mese di trattamento. Tuttavia, questa strategia non può garantire la rigenerazione del tessuto neurodegenerato. Attualmente la riparazione di tessuti degenerati può essere approssiata solo con l'impianto di cellule staminali. Le cellule staminali, infatti, bilanciando *self-renewal* (capacità di auto-mantenimento), differenziamento e plasticità provvedono al rinnovamento e alla riparazione dei tessuti nel corso della intera vita di un individuo. Per questo sono un potente strumento terapeutico.

Noi stiamo sviluppando una linea di ricerca basata sulle potenzialità terapeutiche di due tipi di cellule staminali: le cellule Staminali Neurali e le cellule Staminali Stromali di Midollo Osseo (BMSCs). Lo studio viene effettuato in parallelo ed ha lo scopo di definire il metodo più efficace per la cura delle GM2-gangliosidosi. Le BMSCs sono state isolate dal midollo osseo contenuto nelle ossa lunghe del modello murino della malattia di TS e di Sandhoff nonché dal corrispondente controllo sano. Le BMSCs, corrispondono alla porzione aderente delle cellule staminali del midollo osseo stesso, pertanto possono essere facilmente separate dal resto delle cellule del midollo ed espanse in coltura in opportune condizioni e indotte a differenziare verso fenotipi cellulari così detti non-emopoietici fra i quali va annoverato il fenotipo neurale. Le BMSCs isolate dal modello murino della malattia di TS sono state ingegnerizzate con il vettore retrovirale di cui sopra. Solo nelle cellule BMSCs di topo TS ingegnerizzate veniva ristabilita l'attività enzimatica mancante. Soprattutto, la Esosaminidasi A ricombinante era in grado di ristabilire il difetto metabolico.

La capacità di sopravvivenza, integrazione e differenziamento nel tessuto dell'ospite delle BMSCs trapiantate è un parametro che può essere testato solo attraverso esperimenti *in vivo* ovvero direttamente nei modelli di TS e di Sandhoff. A tale proposito, le BMSCs sono state ingegnerizzate con un vettore retrovirale codificante per la proteina GFP per poter essere monitorate *in vivo*. Le BMSCs-GFP trapiantate in diversi siti del cervello dei modelli animali si sono distribuite uniformemente al suo interno. La plasticità delle BMSCs verso la linea neurale, invece, è stata testata *in vitro*. BMSCs di topo *wild-type* incubate con fattori che inducono differenziamento neurale, hanno trans-differenziato verso neuroni, astrociti e oligodendrociti. Tuttavia il potenziale curativo delle BMSCs si potrà definire solo *in vivo* attraverso il trapianto di queste cellule nei modelli animali.

## INDICE DEGLI AUTORI

Antuzzi, D. ....	17
Bembi, B. ....	25
Castorina, M. ....	17
Cosma, M.P. ....	23
Di Natale, P. ....	21
Donati, M.A. ....	5
Filocamo, M. ....	11
Martino, S. ....	27
Di Domenico, C. ....	21
Orlacchio, A. ....	27
Ricci, R. ....	17
Salvioli, R. ....	13
Scarpa, M. ....	19
Vaccaro, A.M. ....	3
Zammarchi, E. ....	9

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl  
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

*Roma, settembre 2005 (n. 3) 7° Suppl.*