

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
ISTITUTO DI CLINICA NEUROLOGICA
DIR. PROF. G. CAZZATO

Tesi di specializzazione

**STUDIO GENETICO DI UNA FAMIGLIA DI
ORIGINE ISTRORUMENA CON SCLEROSI
LATERALE AMIOTROFICA A TRASMISSIONE
AUTOSOMICA DOMINANTE**

Specializzanda:
Dott.ssa Antonietta Gemma

Relatore:
Chiar.mo Prof. Giuseppe Cazzato

Correlatori:
Chiar.mo Prof. Antonio Amoroso
Dott. Giovanni Masè

ANNO ACCADEMICO 1997/98

INTRODUZIONE

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia degenerativa a decorso progressivo che colpisce sia il primo che il secondo neurone di moto, caratterizzata, sul piano clinico da debolezza ed atrofia muscolare degli arti, deficit della muscolatura bulbare con disfagia, disfonia, disartria, deficit della muscolatura respiratoria ed iperreflessia osteotendinea.

Da quando è stata descritta per la prima volta, circa 120 anni fa, da Jean Martin Charcot, la eziologia e la patogenesi sono rimaste sostanzialmente sconosciute, in particolare per le forme sporadiche (SLAS). Per tale ragione, riteniamo che lo studio delle forme familiari (SLAF), per alcune delle quali è già noto il gene interessato, sia oltremodo importante al fine di definire gli eventi molecolari responsabili del danno cellulare.

Oggetto del nostro lavoro è una messa a punto delle conoscenze attuali sulla SLAF e la descrizione di una famiglia di origine istro-rumena affetta da SLAF di tipo dominante, per la quale è stata avviata l'analisi genetica per ricercare la presenza di una eventuale mutazione nel focus di SOD1.

RISULTATI

L'albero genealogico della famiglia, la cui rappresentazione semplificata è riportata nella Tabella 5, comprende 131 membri distribuiti in 6 generazioni. Sono stati identificati con certezza 7 membri affetti, distribuiti in 2 generazioni, di cui riportiamo una descrizione clinica dettagliata.

CASO 1 (*V 4*) PROBANDO. Uomo di 49 anni, tuttora vivente, che da circa un anno presenta un impaccio motorio alle mani e sensazione di "guizzi" a una ipostenia contro sforzo ai 4 arti con ipotrofia, fascicolazioni, riflessi osteotendinei diffusamente vivaci e coinvolgimento del distretto bulbare con fascicolazioni della lingua, senza segni di coinvolgimento cerebellare e delle sensibilità. La diagnosi SLA viene confermata anche dall'EMG che soddisfa i criteri di Lambert per la malattia del motoneurone. La TAC, la RMN dell'encefalo e del midollo e l'esame del liquor risultano negativi, mentre la scala di Wechsler per l'intelligenza dimostra deterioramento cognitivo.

Si tratta quindi, in questo caso di una malattia dei motoneuroni definita con coinvolgimento clinico del I e del II neurone di moto in tre distretti (SLA con demenza).

CASO 2 (*IV 7*). Uomo deceduto all'età di 65 anni dopo un decorso di malattia di circa 6aa. L'esame obiettivo evidenziava un disturbo di forza prevalente agli arti inferiori con piede cadente bilaterale, diffuse ipotrofie muscolari e riflessi osteotendinei molto vivaci agli arti superiori e deboli agli arti inferiori con segno di Babinski bilaterale. Non vi erano segni di coinvolgimento bulbare e delle sensibilità. L'EXIG confermava un interessamento muscolare di tipo neurogeno ai 4 arti e una modesta diminuzione delle velocità di conduzione motoria dello SPE bilateralmente. In conclusione si trattava di una malattia del motoneurone probabile, con coinvolgimento del I e II neurone di moto, ad epicentro agli arti inferiori (SLA a tipo pseudopolinevrite).

CASO 3 (*IV 10*). Donna di 76 anni, vivente, che da circa 4 anni lamenta una ipostenia ingravescente agli arti inferiori. L'esame neurologico dimostra un grave deficit di forza agli arti inferiori con ipotrofia muscolare diffusa e riflessi osteotendinei deboli o assenti e Babinski bilaterale. Agli arti superiori é presente unicamente una ipotrofia dei piccoli muscoli delle mani bilateralmente. Non si rilevano disturbi delle sensibilità né dei nervi cranici. L'EMG conferma un diffuso interessamento neurogeno ai 4 arti, la RMN dell'encefalo e del midollo risulta negativa. Il quadro depone per una forma di malattia del motoneurone probabile ad inizio agli arti inferiori (SLA a tipo pseudopolinevrite).

CASO 4 (*IV 17*). Donna deceduta a 72 anni dopo 6 anni circa di malattia. L'esame obiettivo evidenziava una ipostenia ai quattro arti con maggior coinvolgimento agli arti inferiori, una ipotrofia marcata dei muscoli delle mani e modesta dei muscoli del cingolo pelvico. I riflessi osteotendinei risultavano diffusamente vivaci con segno di Babinski bilaterale in assenza di disturbi sensitivi, cerebellari e dei nervi cranici. L'EMG deponeva per risultava nella norma. Si tratta di una forma di malattia del motoneurone definita (SLA classica).

CASO 5 (*IV 36*). Donna deceduta all'età di 51 anni, a 2 anni di malattia. L'esame obiettivo neurologico mostrava una grave ipostenia agli arti inferiori con assenza dei riflessi osteotendinei e del segno di Babinski bilateralmente. Ipotrofie muscolari e fascicolazioni erano presenti anche a carico degli arti superiori dove si riscontravano dei riflessi osteotendinei presenti e vivaci. Si segnalava anche un coinvolgimento del distretto bulbare con ipotrofia e fascicolazioni a carico dello sternocleidomastoideo di destra. N7 i era uno scarso coinvolgimento delle sensibilità. L'EMG mostrava segni di sofferenza neurogena agli arti inferiori con velocità di conduzione ai limiti inferiori della norma. In conclusione si trattava di una forma di malattia del motoneurone probabile (SLA a tipo pseudopolinevrite).

CASO G (*IV 18*). Donna vivente di 78 anni con una storia di 10 anni di malattia. Il deficit neurologico si caratterizza per una ipostenia ai quattro

arti, marcata ipotrofia muscolare distale agli arti superiori, con fascicolazioni ed iperelicitabilità dei riflessi osteotendinei che risultano assenti, come il segno di Babinski, agli arti inferiori, dov'è presente ipotrofia distale. Non vi sono disturbi delle sensibilità e dei nervi cranici, l'esame liquorale è normale. Il quadro depone per una malattia del motoneurone probabile (SLA a tipo pseudopolinevrite).

CASO 7 (V 28). Uomo vivente di 57 anni con storia di malattia di 3 anni. L'esame neurologico evidenzia una ipostenia con ipotrofie e fascicolazioni diffuse ai quattro arti, fascicolazioni a carico della lingua, riflessi osteotendinei tutti iperelicitabili con assenza del segno di Babinski. Non vi è interessamento delle sensibilità ma è presente disfonia, disartria. L'esame del liquor risulta negativo, l'EMG evidenzia segni di denervazione diffusa ai quattro arti. Il quadro depone per una forma malattia del motoneurone definita (SLA classica).

In accordo con i criteri di El Escorial, quindi, 3 dei 7 casi sono di SLA definita, gli altri 4 sono di SLA probabile. Inoltre, in 3 casi la malattia si presenta in forma classica, in 3 si tratta di una forma a tipo pseudopolinevrite e in 1 caso ai segni classici si associa anche demenza. In 4 casi la malattia esordisce con un interessamento degli arti inferiori, ed in 3 vi è assenza dei riflessi osteotendinei.

L'età media di insorgenza della malattia è di $59,5 \pm 9,32$ anni (range 49=72) con durata della malattia di $4,6 \pm 2,3$ anni (range 2=6). L'età media dei deceduti è di $62,6 \pm 10,6$ (range 51=72). Considerando nel computo anche altri 7 casi di cui si hanno solo notizie anamnestiche e 4 la cui diagnosi è stata desunta dagli archivi medici, risulta che il rapporto maschi/femmine è di 1:1,33 che non vi sono salti generazionali né anticipazione, che la malattia non è X linked.

L'analisi genetica eseguita non ha evidenziato "pattern" anomali nella corsa dei frammenti amplificati di diversi esoni di SOD1 nei campioni esaminati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le forme familiari di SLA costituiscono una delle principali linee di ricerca importanti per comprendere la patogenesi delle forme sporadiche, di gran lunga più numerose. I dati relativi ai nostri pazienti sono stati confrontati con quelli ottenuti da una rivisitazione della letteratura di oltre duecento famiglie con SLAFD¹. L'unico dato del nostro studio che si discosta da quelli riportati dagli autori è l'età di esordio della malattia che, nella nostra famiglia, risulta essere di $59,9 \pm 5,3$ anni, cioè 10 anni in più rispetto ai dati di confronto e molto simile a quella delle forme sporadiche. Anche nella famiglia, che abbiamo avuto l'opportunità di studiare, abbiamo riscontrato che l'esordio agli arti inferiori e la mancanza dei riflessi è frequente. Per quel che riguarda la durata media della malattia ($4,6 \pm 2,6$), l'eterogeneità del fenotipo e il rapporto fra i due sessi (1:1,33) non sono state trovate differenze sostanziali rispetto ai dati di letteratura.

La mancanza di salti generazionali, di anticipazione della malattia, di trasmissione X linked, concordano con i dati della letteratura. e confermano la modalità di trasmissione di tipo autosomico dominante.

Al momento attuale la forma più conosciuta di SLAM è quella legata alla mutazione del locus genico sul cromosoma 21q21 che codifica per SOD1 (ALS 1).

L'analisi genetica per SOD1 effettuata su alcuni membri della famiglia, oggetto di studio, è risultata negativa per quanto riguarda la presenza di mutazioni nella parte codificante del gene. Non possiamo però escludere con certezza che mutazioni della sequenza non codificante di SOD1 possono essere implicate nel determinare la malattia in questa famiglia. Ciò appare però molto improbabile, poiché solo due delle numerose mutazioni di SOD1, segnalate in letteratura, riguardano sequenze non codificanti.

¹ Jeffrey D. Rothstein, MD, PhD: Excitotoxicity hypothesis. Neurology 1996; 47 (suppl 2): S19-S26.

Recentemente è stata descritta una famiglia con SLAFD, il cui locus genico è stato individuato sul cromosoma 9q34 (ALS4)². La famiglia da noi descritta, non rientrerebbe in questa forma in quanto l'età di esordio della malattia è intorno alla seconda decade e la durata della malattia è molto lunga (fino a 40 anni).

Lo studio delle SLAFD SOD1 ha permesso di comprendere un meccanismo di morte cellulare per apoptosi sostanzialmente legato all'incapacità della cellula di eliminare sostanze tossiche prodotte dal suo stesso metabolismo.

E' stato ipotizzato che la morte cellulare può essere legata ad altri meccanismi quali l'eccitotossicità da eccesso di glutammato. Si suppone che un'alterata capacità di trasporto di questa sostanza nella cellula ne farebbe aumentare la concentrazione in ambiente extracellulare. Attualmente non ci sono dati a favore di un ruolo primario del deficit di trasporto del glutammato nel determinismo della malattia³.

Si comprende da quanto esposto, come siano complessi e ancora sconosciuti i meccanismi patogenetici alla base di questa patologia. Siamo convinti che in futuro il contributo maggiore per la conoscenza di tali meccanismi verrà ancora dagli studi di genetica, attraverso l'identificazione di nuovi foci di malattia. La famiglia da noi descritta potrebbe essere una probabile candidata a tale scopo, se si escludesse il coinvolgimento della SOD1 attraverso analisi di linkage (utilizzando marcatori polimorfici del DNA che mappano sulla regione di SOD1). Nel caso si confermasse una assenza di linkage tra SOD1 e malattia, e fossero recuperati numerosi campioni di materiale genetico di soggetti sani ed affetti, si potrebbe procedere ad uno studio su tutto il genoma per cercare il focus di malattia attraverso uno studio del genoma "wide".

² Change PF, Rabin BA, Ryan SG, Ding Y, Scavina M, Crain B, Griffin JW, Cornblath DR. Linkage of the gene for autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosom 9q34- Am. J. Geneto. 62:633-640, 1998.

³ Jeffrey D. Rothstein, MD, PhD: Excitotoxicity hypothesis. Neurology 1996; 47 (suppl 2): S19-S26.

CENNI STORICI SULLA COMUNITÀ ISTRO-RUMENA⁴

In alcuni villaggi istriani vivono ancora oggi, seppure in numero ridottissimo, gli Istro-rumeni. I più antichi documenti sul loro insediamento nella penisola risalgono al XIV sec., ma si trovano tracce di questa presenza nella zona anche alla fine del Millecento. E' probabile che sia così se si vuol prestar fede allo studio di un filologo rumeno, Traian Cantemir, stando al quale nei secoli XIV e XV i nomi delle persone e altre testimonianze indicavano l'origine rumena per il 15% della popolazione istriana. In quell'epoca il gruppo etnico in parola era diffuso in tutta l'Istria, fino ai dintorni di Trieste o addirittura al Tagliamento, oggi i loro discendenti si trovano ancora in alcuni villaggi del nordest della penisola istriana, sull'altopiano della Ciceria (Zejane - in italiano Sciane - e Mune) e ai piedi del versante occidentale del massiccio dell'Ucka (Monte Maggiore), a Susiljevica (Valdarsa), Brdo (Briani), Cepic (Ceppich), appartenenti al comune di Krsan (Chersano). Alcuni storici li vogliono originari dalla Transilvania, altri dall'entroterra dalmata. Non è escluso che i flussi migratori siano stati due, riguardanti comunque sempre popolazioni neolatine. e indicate come tali dai Germani: Vallachen, da cui lo slavo Vlasi e l'italiano Valacchi. A Venezia venivano chiamati Morlacchi, derivazione abbreviata dal bizantino Mauro – Vlachos, ovvero Valacco nero, com'era definito quello non cittadino per distinguerlo dal Valacco delle città della Dalmazia.

Pur godendo nel Medio Evo di particolari forme di autonomia conferita dai feudatari croati, le grandi ondate migratorie del XVI e XVII sec., provocate dall'avanzata dei Turchi, ne causarono una progressiva slavizzazione che in pratica continua fino ai giorni nostri. Il dominio di Venezia su buona parte dell'Istria e, in questo secolo, il periodo dell'annessione all'Italia durante il fascismo, ne produssero l'italianizzazione. Appare pertanto singolare come, nonostante queste poderose correnti assimilatrici e integratrici e l'assenza di una cultura codificata e istituzionalizzata, l'etnia e la lingua, usi e costumi si siano in

⁴ Mestrovich, E.: appunti personali.

parte conservati in alcuni microcosmi istriani come pure in segmenti generazionali della comunità esodata. La spiegazione di tale eccezionale resistenza etnica va forse cercata nelle vecchie credenze di una nobile eredità di diretta ascendenza Romana che non andava contaminata da altre influenze, fossero di sangue o di cultura. "Confondono cole schiave molte parole Romane -annotava nel XVI sec. lo scrittore veneziano Marcantonio Nicoletti - ma traviate dalla vera pronuncia e per non imprimere alcuna macchia nel sangue non cercano la conversazione de' posterì con altri maritaggi che con le persone paesane". Ovviamente simili impermeabilità ha ceduto cori il progredire degli scambi e delle comunicazioni, che progressivamente hanno eroso e disperso l'etnia che localmente veniva chiamata dei Cici o Ciribiri. Tuttavia tale etnia ha conservato una sua integrità in località minori, protetta suo malgrado dal sottosviluppo, oppure nella lontana America, dove all'estraniamento del nuovo ambiente gli emigrati si opponevano compattandosi nel gruppo. L'alta frequenza di alcuni cognomi testimonia che i matrimoni tra consanguinei ha contribuito, nel bene e nel male, a preservare fino a tempi abbastanza recenti la tenuta di una comunità, così applicando l'antica ricetta a garanzia della esclusività dei Rumeni.