

A Edoardo e Lorenzo

Introduzione	4
---------------------------	---

L'ictus ischemico nel giovane adulto: *considerazioni eziopatogenetiche*

• Epidemiologia e demografici.....	7
• Fattori di rischio per l'ictus ischemico nel giovane adulto.....	8
• Diagnosi eziologica.....	10

La malattia di Fabry: *generalità*

• Epidemiologia.....	25
• Manifestazioni cliniche.....	26
• Eziopatogenesi.....	32
• Diagnosi.....	33
• Terapia enzimatica sostitutiva.....	34

Patologia cerebrovascolare in corso di malattia di Fabry

• Tipologia e meccanismi eziopatogenetici.....	38
• Frequenza dell'ictus cerebrale in corso di malattia di Fabry.....	41
• Reperti neuroradiologici in corso di malattia di Fabry.....	43
• Clinica dell'ictus cerebrale in corso di malattia di Fabry.....	48

I sezione sperimentale

Screening per la malattia di Fabry in giovani adulti affetti da ictus cerebrale.....50

Frequenza della malattia di Fabry in una serie continua di giovani adulti con patologia cerebrovascolare ischemica acuta, ricoverati presso la Stroke Unit e Neurologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria

Careggi, Firenze

• Background ed obiettivo del progetto.....	51
• Metodi.....	54
• Risultati.....	58
• Discussione.....	63
• Conclusioni.....	69

Eziologia dell'ictus ischemico giovanile in una serie continua di pazienti ricoverati presso la Stroke Unit e

• Background ed obiettivo dello studio.....	71
• Metodi.....	72
• Risultati.....	74
• Discussione.....	84
• Conclusioni.....	89

II sezione sperimentale

Interessamento cerebrovascolare in corso di malattia di Fabry..	91
--	----

Ictus ischemico cerebrale in corso di malattia di Fabry: frequenza, caratteristiche clinico-radiologiche e risposta alla terapia enzimatica sostitutiva in una serie di cinquantasette pazienti italiani in follow up neurologico presso il Centro di Riferimento per la malattia di Fabry dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

• Background ed obiettivo dello studio.....	92
• Metodi.....	93
• Risultati.....	97
- Caratterizzazione clinico-radiologica dell'ictus cerebrale in corso di malattia di Fabry	
- Analisi del fenotipo clinico sistemico "Fabry" in relazione alla presenza di ictus ischemico	
- Analisi delle caratteristiche neuroradiologiche in relazione alla presenza di ictus ischemico	
- Analisi dei fattori di rischio vascolare in relazione alla presenza di ictus ischemico	
- Terapia enzimatica sostitutiva ed ictus ischemico cerebrale	
• Discussione.....	115
• Conclusioni.....	123

Partecipazione allo studio multicentrico internazionale (ongoing): "A randomized, open-label study to compare the efficacy and safety of AT1001 and Enzyme Replacement Therapy (ERT) in patients with Fabry disease and AT1001-responsive GLA mutations who were previously treated with ERT".....

Riferimenti bibliografici.....	129
--------------------------------	-----

Ringraziamenti.....	144
---------------------	-----

Premessa

Durante il percorso di Dottorato di Ricerca in Psicologia e Neuroscienze, indirizzo in Neuroscienze, ho svolto attività di ricerca in ambito clinico.

Il mio progetto di ricerca è stato incentrato sulla relazione tra malattia di Fabry ed ictus cerebrale ed è stato articolato su due obiettivi principali:

1. Determinazione della frequenza della malattia di Fabry nel setting dei pazienti affetti da ictus cerebrale in età giovanile
2. Descrizione delle caratteristiche cliniche, radiologiche e della risposta alla terapia enzimatica sostitutiva dell'ictus ischemico in corso di malattia di Fabry

La malattia di Fabry è una sfingolipidosi, ovvero una patologia da accumulo lisosomiale rara, con manifestazioni cliniche multi-sistemiche, per la quale è disponibile da pochi anni un trattamento enzimatico sostitutivo.

In considerazione della rarità della condizione, le informazioni circa la storia naturale della malattia e la sicurezza ed efficacia della terapia specifica sono spesso limitate ed aneddotiche.

Presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi sono presenti da molti anni:

- un Centro di Riferimento per la malattia di Fabry a composizione multidisciplinare, che include neurologi, cardiologi, nefrologi, oculisti, dermatologi, immunologi, genetisti, biologi e biochimici con expertise, riconosciuto a livello nazionale ed internazionale, sia in ambito clinico sia scientifico nei confronti di questo raro disordine monogenico
- un Centro di Riferimento per l'ictus cerebrale anch'esso riconosciuto a livello nazionale ed internazionale quale centro di eccellenza sia in ambito clinico che scientifico nei confronti di questa frequente e grave patologia

Il progetto di ricerca clinica di questa tesi è stato condotto in stretta collaborazione con queste due strutture. Sono afferiti al Centro di riferimento per la malattia di Fabry pazienti provenienti dalle province italiane di Firenze, Pisa, Arezzo, Livorno, Terni, Perugia, Roma, Viterbo, Civitavecchia, Foggia, Catania, Palermo, Monza, con i cui ospedali esiste una storica collaborazione per la gestione clinico-terapeutica della malattia e la ricerca clinica (particolarmente in ambito neurologico).

La candidata ha condotto in prima persona raccolta, archiviazione informatica, analisi statistica e discussione alla luce della letteratura internazionale dei dati di interesse di entrambi i progetti. Ha inoltre collaborato con i laboratori di malattie Neurometaboliche dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer e di Diagnostica Genetica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi per l'esecuzione delle eventuali indagini di laboratorio necessarie (dosaggio enzimatico ed analisi genetica).

I risultati dei progetti sono stati preliminarmente sottomessi, accettati e discussi in rilevanti congressi nazionali (XLII Convegno della Società Italiana di Neurologia, 2011; Italian Strokeforum, 2012, XLIII Convegno della Società Italiana di Neurologia, 2012; XLIV Convegno della Società Italiana di Neurologia, 2013) ed internazionali (XXI European Stroke Conference, 2012; XXII European Stroke Conference, 2013; 65th American Academy of Neurology Annual Meeting, 2013), e sono attualmente in fase di pubblicazione.

La candidata ha inoltre partecipato durante il Dottorato di Ricerca alla realizzazione di studi clinici internazionali riguardanti l'ictus ischemico o le malattie lisosomiali, sia in ambito epidemiologico che terapeutico:

- EIS: development of a european implementation score for measuring implementation of research into helthcare practice using vascular disease as an example

- A randomized, open-label study to compare the efficacy and safety of AT1001 and Enzyme Replacement Therapy (ERT) in patients with Fabry disease and AT1001-responsive GLA mutations who were previously treated with ERT (AT1001-012)
- A phase 3, randomized, multi-center, multi-national, open label, active comparator study to evaluate the efficacy and safety of Genz-112638 in patients with Gaucher disease who have reached therapeutic goals with enzyme replacement therapy (ENCORE)

In questa tesi saranno discussi i progetti scientifici inerenti la malattia di Fabry.

Introduzione

L'ictus ischemico nel giovane adulto:

Considerazioni eziopatogenetiche

L'ictus cerebrale è una patologia rilevante per frequenza, mortalità e disabilità residua, sia fisica che cognitiva. Essendo la sua incidenza età-correlata, l'ictus è poco comune nei soggetti giovani-adulti, tuttavia proprio in questa categoria la patologia cerebrovascolare presenta le conseguenze più negative, in termini di anni lavorativi persi ed impatto sulla qualità di vita del paziente e del suo *care giver*.

Non esiste una definizione condivisa di ictus giovanile; autori differenti utilizzano quale limite temporale età comprese tra 65 e 45 anni, anche se la maggior parte dei lavori adotta il *cut-off* più selettivo, ovvero i 45 anni di età.

Il riconoscimento della corretta eziologia dell'ictus cerebrale, spesso eterogenea e multifattoriale, è il fondamento sia della terapia di prevenzione secondaria che della formulazione della prognosi individuale. Nell'anziano circa l'80% degli ictus ha natura ischemica ed è conseguenza di 3 principali meccanismi: l'aterosclerosi dei grandi vasi intra- o extracranici, la cardioembolia e la malattia dei piccoli vasi cerebrali; al contrario, nel soggetto giovane adulto, la patologia cerebrovascolare ischemica è meno rappresentata ed è più frequentemente conseguenza di un vasto gruppo di malattie rare, anche su base genetica, la cui identificazione è spesso difficoltosa¹. Si stima che circa un terzo degli ictus del giovane adulto abbia una natura criptogenica¹; inoltre malattie genetiche possono causare ictus attraverso i meccanismi eziopatogenetici classici, potendo quindi nascondersi all'interno di queste sottocategorie.

Epidemiologia e demografici:

Nei paesi occidentali, meno del 5% degli ictus insorge prima dei 45 anni di età², mentre tassi più elevati, compresi tra il 19% ed il 30% sono riportati nei paesi in via di sviluppo³. Uno studio di popolazione italiano condotto all'Aquila nel 2001 ha rilevato un tasso di incidenza annuale di 10 casi per 100 000 abitanti⁴. Il 43% degli ictus giovanili risultava inoltre possedere una natura emorragica (emorragia subaracnoidea o emorragia parenchimale primitiva), e dunque solo un 57% degli episodi era di tipo ischemico⁴. In uno studio finlandese condotto su una coorte ospedaliera, l'incidenza annuale dell'ictus aumentava da 2,4 casi per 100 000 per i pazienti di età compresa tra 20-24 anni, a 4,5 casi per 100 000 per i pazienti di età compresa tra 30-34 anni, e fino a 32,9 casi per 100 000 per i pazienti di età compresa tra 45-49 anni⁵.

In merito alle differenze nell'incidenza dell'ictus nei due sessi, sono presenti delle distinzioni in relazione all'età dei pazienti. Infatti, contrariamente a quanto avviene nella popolazione generale, nella fascia di età < 45 anni prevalgono i soggetti di sesso femminile⁶

Fattori di rischio per l'ictus ischemico nel giovane adulto:

Le conoscenze circa la tipologia e frequenza dei fattori di rischio nel giovane adulto affetto da ictus cerebrale è principalmente derivata da studi che sono stati condotti su coorti ospedalizzate. E' opinione diffusa che i fattori di rischio vascolare tradizionali siano scarsamente rappresentati in età giovanile, tuttavia dati provenienti da studi recenti hanno recentemente fornito nuove informazioni su questo punto. Il SIFAP^{6,7} è un trial multicentrico europeo che ha arruolato una popolazione di circa 5 000 giovani adulti (18-55 anni) ricoverati per un episodio cerebrovascolare (TIA, ictus ischemico o emorragico), i cui risultati sono stati

pubblicati nel corso del 2013. In questa popolazione l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia, il fumo di sigaretta ed il diabete mellito erano presenti rispettivamente nel 47%, 41%, 34% e 10% dei pazienti; gli autori hanno osservato, come del resto prevedibile, un significativo incremento della loro prevalenza in relazione alle differenti classi di età dei pazienti (18-24; 25-34; 35-44; 45-55), fatta eccezione per il fumo di sigaretta, molto rappresentato anche tra i pazienti più giovani. Altri fattori di rischio vascolare "classici" discretamente rappresentati risultavano l'obesità (22%) e la comorbidità cardiovascolare (9%), mentre la fibrillazione atriale era presente solamente nel 2.4% del campione. Inoltre tutti i fattori citati risultavano significativamente più rappresentati nei maschi che nelle femmine con l'unica eccezione dell'emicrania (38% vs 19% dei pazienti)⁶.

E' noto che il rischio di ictus ischemico nelle persone che soffrono di emicrania, particolarmente della forma con aura, è doppio rispetto alla popolazione generale⁸. Un'età inferiore ai 45 anni, l'associazione con fumo e con estroprogestinici incrementa ulteriormente il rischio. Tuttavia il meccanismo con cui questo fenomeno si verifica non è noto: da una parte l'ipoperfusione cerebrale conseguente al vasospasmo che si sviluppa durante una crisi emicranica può essere causa del cosiddetto "infarto emicranico", spesso localizzato nel territorio circolatorio posteriore e sovrastimato; dall'altra si ritiene che l'emicrania con aura possa essere associata a condizioni che sono di per sé causa di ictus (ad es. forame ovale pervio, dissecazione vascolare) o far parte di spettri di patologie che si complicano con ictus (ad es. la CADASIL o la MELAS).

In merito ai contraccettivi orali è stato chiaramente documentato nelle donne che li assumono un rischio aumentato di ictus ischemico, seppur contenuto (4 casi per 100 000 donne che assumono estroprogestinici)⁹. In casistiche distinte di ictus giovanile sono state riscontrate frequenze di assunzione dei contraccettivi orali comprese tra il 7%⁵ ed il 45%¹⁰. Il rischio

cerebrovascolare sembra direttamente proporzionale al contenuto di estrogeni della pillola, e pertanto le pillole a contenuto di solo progesterone risulterebbero sicure⁹.

Altri fattori di rischio non convenzionali frequentemente rappresentati nella popolazione giovanile sono l'abuso alcolico (fino al 33% dei pazienti del SIFAP) e di droghe (sia ad azione simpatico-mimetica che ad iniezione endovenosa, tramite meccanismi di embolizzazione di materiale esogeno o endocardite).

Diagnosi eziologica:

La diagnosi clinica di ictus ischemico viene generalmente posta fin dal pronto soccorso in presenza di un esordio acuto di segni e sintomi neurologici focali (compatibili con un territorio arterioso cerebrale) e di fattori di rischio vascolare. Tuttavia nel giovane adulto, e soprattutto nelle età più precoci, l'assenza di fattori di rischio vascolare può creare una maggiore incertezza diagnostica. Lo spettro delle diagnosi differenziali dell'ictus in questa età include la sclerosi multipla, il disturbo somatoforme, l'emigrania con aura prolungata, i deficit neurologici post-critici, le neoplasie e meno frequentemente le encefaliti. La RMN encefalo con sequenze DWI può confermare ed escludere molte di queste condizioni, e pertanto sta emergendo fin dalle primissime fasi del ricovero ospedaliero, quale utile strumento del percorso diagnostico.

L'individuazione dell'eziopatogenesi dell'ictus è il successivo tassello del percorso diagnostico, in quanto fondamento nella terapia di prevenzione secondaria e nella formulazione della prognosi individuale. Come precedentemente introdotto l'eziopatogenesi

dell'ictus giovanile differisce da quella dell'anziano, soprattutto per le alte frequenze degli ictus di tipo criptogenico e da altre rare cause identificabili¹¹⁻¹⁶.

Le categorie di ictus meno rappresentate risultano la malattia del piccolo vaso (per cui sono state riportate nei diversi studi frequenze comprese tra 0¹³ - 15%^{12,14}) e la malattia delle grandi arterie intra- ed extracraniche (8¹⁵ - 27%¹³). La malattia del piccolo vaso (occlusione di un'arteria perforante, in genere a seguito di ipertensione e diabete) è stata associata più frequentemente al sesso maschile¹⁶ ed è tendenzialmente assente al di sotto dei 35 anni di età; quindi, soprattutto in pazienti molto giovani, l'individuazione di piccoli infarti lacunari deve far pensare ad altre cause rare, quali le microangiopatie genetiche (CADASIL, Fabry), le vasculiti, le infezioni o la microembolia a partenza cardiaca. La malattia dei grandi vasi intra- ed extracranici, con l'eccezione della dissecazione vascolare (che però viene identificata come altra causa specifica di ictus), è anch'essa poco frequente, e generalmente associata al sesso maschile e alla dislipidemia¹⁶.

La frequenza della cardioembolia si attesta nelle varie casistiche attorno al 20-25%¹²⁻¹⁶, ed anche in questo caso sembrano emergere alcune peculiarità rispetto all'anziano. In un recente studio multicentrico europeo sull'eziologia dell'ictus ischemico giovanile, Yesilot Barlas¹⁶ et al. hanno documentato che la cardioembolia era responsabile del 17% degli eventi e che il 50% degli ictus cardioembolici conseguiva ad una fonte "a basso" rischio emboligeno, ovvero alla presenza di forame ovale pervio e/o aneurisma del setto interatriale. Tra le fonti ad alto rischio venivano riportate la fibrillazione atriale (15% degli ictus cardioembolici), la valvulopatia (7,6%) e l'acinesia della parete del ventricolo sinistro per infarto miocardico (7%); in generale una parte significativa degli eventi conseguiva a malattie cardiache più rare, come cardiomiopatie, malformazioni cardiache congenite, endocarditi, fibroelastoma dei muscoli papillari, mixoma, sarcoidosi. In merito alle differenze di genere, nei soggetti

maschili veniva individuata una leggera prevalenza delle forme ad alto rischio emboligeno, mentre nelle donne di quelle a basso rischio ($p = 0,049$).

Il forame ovale pervio (FOP) è un residuo della circolazione fetale che rimane pervio in circa il 25% della popolazione generale. In vari lavori scientifici di tipo caso-controllo è stata documentata un'associazione tra FOP ed ictus criptogenico: in una metanalisi del 2009 è stato individuato un OR di 2,9 (IC 95%: 2,1-4,0), e l'OR era ancora più elevato se venivano analizzati solamente i pazienti più giovani, con < 55 anni di età (5,1; IC 95% 3,3-7,8)¹. Oltre all'età, incrementano il rischio di ictus in corso di FOP l'esistenza e l'estensione dello shunt destro-sinistro e la concomitante presenza di un aneurisma del setto interatriale¹⁷. Tuttavia il ruolo del FOP nel determinismo dell'ischemia cerebrale è ancora oggetto di ricerca, in quanto studi longitudinali non sono stati capaci di documentare un incremento del rischio di primo ictus¹⁸ o ricorrenza¹⁹ nei pazienti con FOP. Si ritiene che il FOP sia causa di ictus ischemico principalmente attraverso fenomeni di embolia paradossa: un coagulo derivato dal sistema venoso (ad es. una trombosi venosa profonda) potrebbe attraversare questo forame per immettersi direttamente nel letto vascolare arterioso, bypassando il circolo polmonare.

Alternativamente, ad es. se associato ad aneurisma del setto, potrebbe essere una causa diretta di formazione del trombo, o partecipare alla genesi di fenomeni di tipo aritmico. Di fatto, data l'alta prevalenza del FOP nella popolazione generale, fino ad 1/3 dei pazienti con ictus può presentare coincidentalmente un FOP, e quindi prima di stabilire un nesso causa-effetto tra esso e l'ischemia cerebrale, deve essere condotta una diagnostica differenziale approfondita.

L'insieme delle altre cause identificabili di ictus giovanile si presenta nelle differenti casistiche con una frequenza complessiva che è compresa tra il 19%¹² ed il 38%¹⁴, pur derivando questa categoria dall'associazione di patologie rare (ad es. sindrome da anticorpi antifosfolipidi, vasculite) o molto rare (ad es. disordini genetici), con l'unica eccezione della dissecazione vascolare.

La dissecazione vascolare può colpire l'arteria carotide interna, originando pochi centimetri dopo la biforcazione della carotide comune, o l'arteria vertebrale, a livello del suo ingresso nel forame intervertebrale o quando lo abbandona per perforare la dura madre, ed è multipla in circa 1/4 dei casi. Il processo di slaminamento della parete vascolare si sviluppa in genere a livello subintimale, causando una stenosi irregolare del lume, con aspetto a coda di topo; meno frequentemente si può assistere ad una fissurazione sub-avventiziale con genesi di uno pseudoaneurisma. Se la dissecazione origina o si estende allo spazio intracranico si può complicare con un sanguinamento a sede subaracnoidea. Da un punto di vista patogenetico esistono ancora delle incertezze. In una certa proporzione di casi è possibile identificare un trauma coinvolgente il collo o la testa, anche di lieve entità a precedere l'esordio della dissecazione; altre più rare volte, soprattutto in presenza di una dissecazione recidivante o multipla, la fragilità del vaso è conseguenza di una sottostante malattia del collagene; di fatto nella maggior parte dei pazienti la dissecazione è classificata come un fenomeno spontaneo o idiopatico. I segni clinici suggestivi di dissecazione sono la presenza di cefalea o dolore cervicale, segni locali (sindrome di Bernard -Horner, paralisi isolate di nervi cranici, ad es. il XII n.c.) con o senza deficit neurologici focali conseguenti all'ischemia cerebrale. La diagnosi viene posta attraverso l'utilizzo di ultrasuoni e soprattutto di angio TC (sensibilità 92-100%) o angio RMN (sensibilità 87-100%, è considerata in genere l'esame di prima scelta, in quanto non necessita di contrasto e permette di visualizzare l'ematoma intramurale nelle sequenze assiali T1-pesate con fat-suppression). L'angiografia digitale è attualmente riservata a casi selezionati in cui le metodiche non invasive sono risultate contraddittorie o non conclusive. Il rischio di ricorrenza è basso (<1%) e tendenzialmente più frequente nei casi sintomatici per ischemia cerebrale; le recidive ischemiche si verificano spesso nel primo mese²⁰.

Particolarmente nei paesi in via di sviluppo, una quota non trascurabile degli ictus giovanili è dovuta ad infezione, ovvero ad arteriti infettive o cardiomiopatie infettive, con una frequenza che è strettamente legata al carico di infezione che caratterizza quella specifica regione del

mondo (ad es. cisticercosi o malattia di Chagas nel Sud America, sifilide e tubercolosi nel subcontinente indiano, HIV nell’Africa subsahariana)¹. Nei paesi occidentali l’ictus da causa infettiva è raro ed i patogeni più spesso responsabili risultano il virus della Varicella Zoster (VZV) ed HIV. L’arterite da VZV può colpire sia i pazienti immunocompetenti che quelli immunocompromessi, in genere a 2 settimane di distanza dall’infezione. Più spesso è la complicazione di uno Zoster oftalmico, la cui risoluzione si complica mediante l’insorgenza acuta di deficit neurologici focali controlaterali. La diagnosi viene confermata dal riscontro nel liquor di DNA virale o titoli anticorpali anti VZV. L’infezione da HIV invece può causare ictus attraverso molteplici meccanismi, che includono oltre all’infezione diretta delle arterie, più spesso di medio o grande calibro, fattori ematologici o un’aterosclerosi accelerata e conseguente alla terapia antiretrovirale.

Un’altra rara causa di ictus è rappresentata dalle vasculiti primitive o secondarie del SNC e dalle malattie del tessuto connettivo. Tra le malattie autoimmuni sistemiche la presentazione con ictus è inusuale, fatta eccezione per il Lupus eritematoso sistemico, la sindrome da anticorpi antifosfolipidi, l’arterite temporale di Horton (a cellule giganti) e l’arterite di Takayasu¹. Meno frequentemente malattie come la sindrome di Churg Strauss, la granulomatosi di Wegener, la poliarterite nodosa, la crioglobulinemia, la malattia di Behcet, le malattie infiammatorie croniche intestinali e la sarcoidosi si complicano con ictus¹. Anche la vasculite primitiva del SNC si presenta poco frequentemente con ictus, ma piuttosto con sintomi espressione di un’encefalopatia diffusa e cefalea¹. Nella tabella 1 sono riportate le caratteristiche salienti delle principali vasculiti sistemiche e connettivopatie associate ad ictus, con descrizione del meccanismo eziopatogenetico dell’ischemia cerebrale e degli eventuali altri sintomi neurologici e sistemici associati.

Tabella 1. Rappresentazione sinottica delle caratteristiche cliniche, neurologiche e sistemiche, delle principali malattie disimmuni associate ad ictus cerebrale

Patologia	Principali anomalie ai test di laboratorio	Meccanismo ictus ischemico	Altri disturbi neurologici	Manifestazioni sistemiche
Lupus eritematoso sistemico	Anti-ANA; Anti-DNA (ds);	Vasculite dei vasi di piccolo calibro Microangiopatia ipertensiva Cardioembolia Stato protrombotico	Disturbi cognitivi e dell'umore; cefalea; crisi epilettiche; meningite asettica; sindrome demielinizzante; mielopatia; neuropatia periferica	Astenia; febbre; artralgie; mialgie; rash cutaneo; anemia, leucopenia, piastrinopenia; pleurite; endocardite; miocardite; insufficienza valvolare; proteinuria; insufficienza renale cronica; tromboembolia; vasculite retinica
Sindrome da anticorpi antifosfolipidi	LAC, Anti-Fosfolipidi; Anti-Cardiolipina; Anti-Beta2 glicoproteina	Trombosi arterie di medio e grosso calibro	Cefalea; trombosi venosa cerebrale; crisi epilettiche; deficit cognitivi; mielopatia	Aborti nel primo trimestre; tromboembolia arteriosa e venosa
Arterite a cellule giganti	Aumento indici di flogosi	Vasculite arterie di medio e grosso calibro (rami carotidei)	Cefalea	Febbre; polimialgia reumatica; claudicatio mandibolare; neurite ottica ischemica; infarto miocardico
Arterite di Takayasu	Aumento indici di flogosi	Vasculite arterie di medio e grosso calibro (rami dell'arco aortico)	Amaurosi fugace; vertigini	Febbre; artralgie; assenza di polsi; fenomeno di Raynaud; ipertensione; insufficienza renale; infarto miocardico; insufficienza valvolare; dolori addominali; claudicatio arti inferiori e superiori
Sindrome di Churg-Strauss	Eosinofilia	Vasculite dei vasi di piccolo calibro	---	Astenia; febbre; asma; infiltrati polmonari; noduli cutanei e sottocutanei; cardiopatia
Vasculite di Wegener	c-ANCA	Vasculite dei vasi di piccolo calibro	Neuropatia periferica	Flogosi cronica delle alte vie aeree; ulcere nasali sino alla perforazione del setto; otite media sierosa; dispnea; emottisi; infiltrati polmonari; congiuntivite; episclerite; sclerite; lesioni cutanee; miocardite; vasculite coronarica; glomerulonefrite; insufficienza renale
Poliarterite nodosa	Aumento indici di flogosi; leucocitosi; p-ANCA	Vasculite dei vasi di medio e piccolo calibro	Disturbi cognitivi e dell'umore; crisi epilettiche; neuropatia periferica	Astenia; febbre; artrite; mialgia; insufficienza renale; ipertensione; infarto organi addominali; rash cutaneo, fenomeno di Raynaud; infarto miocardico, pericardite
Angioite primitiva del SNC	--- (linfocitosi e aumento proteine liquorali)	Vasculite dei vasi di medio e piccolo calibro	Cefalea; deficit cognitivi; crisi epilettiche; disturbo del visus	---
Malattia di Behcet	Aumento indici di flogosi; pathergy test	Vasculite dei vasi di piccolo calibro	Trombosi dei seni venosi; meningoencefalite infiammatoria del tronco encefalico; disturbi psichiatrici	Ulcere orali e genitali; follicolite ed eritema nodoso; irite, uveite posteriore, vasculite retinica; artrite; tromboembolia

p-ANCA= anticorpi perinucleari anti-citoplasma dei neutrofilii; c-ANCA= anticorpi citoplasmatici anti-citoplasma dei neutrofilii; ANA= anticorpi anti-nucleo; LAC= lupus anticoagulant

Nella maggior parte di queste malattie l'ictus è determinato dall'occlusione di vasi di medio o piccolo calibro, ed associato a cefalea. Altre manifestazioni neurologiche descritte sono: deficit cognitivi o comportamentali, crisi epilettiche, sintomi conseguenti a lesioni cerebrali infiammatorie o a meningite asettica. In alcuni casi la manifestazione cerebrovascolare prevalente è la trombosi dei seni venosi (ad es. nella malattia di Behcet). Uno dei settori più interessanti della ricerca eziopatogenetica sull'ictus giovanile è quello della ricerca delle cause ereditarie. Negli ultimi anni, infatti, i progressi delle tecniche di genetica-molecolare hanno permesso di ampliare costantemente il numero di geni associati ad ictus. L'interazione tra geni e stroke può svilupparsi a vario livello, potendo essi agire sui fattori di rischio vascolare tradizionali o essere responsabili dell'instaurarsi del meccanismo patogenetico dell'ictus, ad es. la microangiopatia cerebrale. Fattori genetici possono inoltre influenzare la latenza con cui si sviluppa l'ictus o le sue dimensioni e prognosi²¹. Sono ad oggi note oltre 50 disordini monogenici associati a stroke, che tuttavia, complessivamente, spiegano solo l'1% degli eventi²²; in alcuni di essi l'ictus è la prevalente conseguenza del difetto genetico, in altre è solo una parte di una più larga manifestazione.

Nella tabella 2 sono schematizzate le più rilevanti patologie monogeniche che conducono ad ictus, tra cui la malattia di Fabry, che sarà oggetto di dettagliata descrizione nella prossima sezione. I disordini monogenici sono tipicamente causa di ictus nell'infanzia o nella prima fase della vita adulta, in assenza di altri fattori di rischio vascolare ed in associazione a fenotipi specifici e generalmente poco conosciuti di malattia.

Tabella 2. Rappresentazione sinottica delle principali caratteristiche cliniche, neurologiche e sistemiche, dell'ictus associato a malattie genetiche

Patologia	Modalità di trasmissione	Gene	Meccanismo dell'ictus ischemico	Altri disturbi neurologici	Segni e sintomi sistemici
Malattia di Fabry	X-linked	GLA	Malattia del piccolo vaso; ateroembolia da vaso dolicoectasico; cardioembolia	Acroparestesie dolorose febbrili; disautonomia; ipoacusia neurosensoriale e disfunzione labirintica da accumulo; cefalea	Angiocheratoma; cornea verticillata; proteinuria; insufficienza renale cronica; cardiopatia ipertrofica
CADASIL	AD	NOTCH3	Malattia del piccolo vaso	Emicrania; demenza vascolare; paralisi pseudobulbare; disturbi dell'umore	---
CARASIL	AR	HTRA1	Malattia del piccolo vaso	Demenza vascolare; paralisi pseudobulbare; disturbi dell'umore;	Alopecia frontale (nell'adolescenza); spondilosi deformante lombare
RVCL (vasculopatia retinica con leucodistrofia)	AD	TREX1	Malattia del piccolo vaso	Emicrania; demenza vascolare; disturbo dell'umore	Perdita del visus (retinopatia vascolare); insufficienza renale cronica; fenomeno di Raynaud
Microangiopatia associata a COL4A1	AD	COL4A1	Malattia del piccolo vaso	Ictus emorragico; demenza vascolare; paralisi cerebrale infantile (emorragia peri-parto)	Cataratta; glaucoma; disgenesia del segmento anteriore dell'occhio; fenomeno di Raynaud; disfunzione renale
Sindrome di Ehler-Danlos tipo IV	AD	COL3A1	Dissecazione di grande vaso	Aneurismi intracranici, fistole arterovenose carotidee	Cute diafana con vene ben visibili; rottura di organo cavo
Sindrome di Marfan	AD	FBN1	Dissecazione di grande vaso; cardioembolia	Ectasia durale lombosacrale; ematoma sottodurale	Pectus carinatum o excavatum; dolicoostenomelia; ectopia del cristallino; dilatazione-dissecazione dell'aorta ascendente; valvulopatia cardiaca
Pseudoxantoma elastico	AR	ABCC6	Malattia dei grandi vasi; malattia del piccolo vaso	---	Aumentata elasticità cutanea; anomalie oculari
Omocistinuria	AR	CBS e altri	Aterosclerosi dei grandi vasi; malattia del piccolo vaso	Ritardo mentale	Ectopia del cristallino; habitus marfanoido; osteoporosi; tromboembolia
MELAS	Matrilineare	mtDNA	Disfunzione energetica neuronale; disfunzione delle arterie cerebrali	Cefalea simil-emicranica; crisi epilettiche; ipoacusia neurosensoriale; declino cognitivo; miopatia	Bassa statura; acidosi lattica; diabete; cataratta; vomito episodico
Anemia a cellule falciformi	AR	HBB	Malattia dei grandi vasi con insufficienza emodinamica; malattia del piccolo vaso; iperviscosità	Ictus emorragico (ESA); crisi epilettiche	Anemia; infarti ossei, polmonari, epatici, splenici
Moya-Moya familiare	AD	Non noto, legato a cromosoma 3 e cromosoma 17	Malattia dei grandi vasi, particolarmente carotide intracranica, con sviluppo di vistoso circolo collaterale satellite (vasi Meiamola)	ESA, emorragia parenchimale, emorragia intraventricolare (ictus ischemico prevalentemente nel bambino)	---

La principale causa di ictus in epoca infantile è l'anemia a cellule falciformi, una malattia a trasmissione autosomica recessiva, legata ad uno stato di omozigosi per HbS, o ad uno stato di eterozigosi tra HbS ed altre emoglobinopatie, come la alfa-talassemia o la HbC²³. I pazienti affetti da anemia a cellule falciformi tendono a sviluppare ictus ischemico in epoca precoce, ed emorragia cerebrale nelle età più avanzate (> 45 anni). L'ischemia cerebrale consegue ad una malattia delle grandi arterie intracraniche, soprattutto carotide e cerebrale media, ed è spesso sotto forma di infarti emodinamici. Il rischio di ictus viene sostanzialmente ridotto dalla terapia trasfusionale, e pertanto nei bambini con questa condizione viene effettuato un monitoraggio mediante doppler transcranico delle velocità di flusso delle arterie del poligono del Willis, al fine di identificare i pazienti a maggior rischio da sottoporre a trasfusione ematica.

Nel giovane adulto invece molta attenzione è stata rivolta negli ultimi anni al riconoscimento delle varie microangiopatie cerebrali ereditarie, tra cui la CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy), la quale è stata tra le prime forme di malattia del piccolo vaso ad essere caratterizzata da un punto di vista genetico. Questa condizione, trasmessa con modalità autosomica dominante, è diffusa in tutto il mondo ed interessa diversi gruppi etnici. La sua prevalenza è stimata intorno a 2 casi per 100 000²⁴. Il fenotipo clinico è in genere caratterizzato da cinque sintomi distintivi: emicrania con aura, ictus ischemico lacunare, disturbo dell'umore, apatia e progressivo decadimento delle funzioni cognitive fino alla demenza²⁵. Solitamente il primo sintomo è l'emicrania, con esordio intorno ai 30 anni, seguito dal ricidivare di episodi di ischemia cerebrale, localizzati a livello di talamo, gangli della base e sostanza bianca emisferica. Alla risonanza magnetica cerebrale sono presenti dei segni tipici, in particolare una leucoencefalopatia progressiva che coinvolge la capsula esterna ed i poli temporali, con progressione età correlata²⁶.

Il gene responsabile della CADASIL è localizzato sul cromosoma 19 ed è noto come NOTCH3. Tale gene codifica per un recettore cellulare di superficie, implicato nello sviluppo delle arterie ed espresso sulle cellule muscolari lisce vascolari. Il meccanismo con cui le mutazioni di NOTCH3 conducono all'arteriopatia non è noto, anche se sembra che ci sia un accumulo dei recettori mutanti all'interno delle pareti vascolari. Studi di microscopia elettronica hanno evidenziato depositi osmiofilici granulari a livello della lamina basale delle arterie di tutto l'albero vascolare, che sono specifici per CADASIL e possono essere utilizzati a fini diagnostici²⁷.

Una condizione monogenica più rara ma per la gran parte degli aspetti sovrapponibile alla CADASIL è la CARASIL (Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy), o sindrome di Maeda, di cui sono ad oggi conosciuti nel mondo pochi casi e quasi esclusivamente in pazienti di etnia asiatica²⁵. Oltre alla modalità di trasmissione autosomica recessiva, la CARASIL si distingue per l'età di esordio più precoce e per la presenza di sintomi extra-neurologici, tra cui i più caratteristici risultano l'alopecia e la spondilosi deformante. L'alopecia è confinata alla testa, in particolare alle regioni frontali e parietali, ed esordisce nell'adolescenza. La spondilosi è più spesso localizzata a livello della colonna lombare, ed associata anche ad altre anomalie ossee, quali stenosi del canale cervicale ed artropatia del ginocchio. Sono inoltre presenti anomalie oculari, quali neurite ottica, retinopatia, arteriosclerosi dell'occhio. Il gene responsabile della CARASIL, denominato HTRA1, è localizzato sul cromosoma 10 e codifica per una proteasi implicata nei meccanismi di regolazione del segnale mediato da TGF β .

La Vasculopatia cerebroretinica con leucodistrofia è un'altra patologia monogenica di recente identificazione, caratterizzata da interessamento microvascolare a livello di encefalo ed occhio. La trasmissione è autosomica dominante, legata al gene TREX 1, sito sul cromosoma 3²⁵. Il fenotipo clinico è quasi sempre caratterizzato da disturbi del visus in conseguenza di

degenerazione dei capillari retinici (microaneurismi e obliterazione) e ictus ischemici di tipo lacunare, con esordio tra la quarta e la quinta decade. In alcuni casi è presente un coinvolgimento sistemico con manifestazioni cutanee (fenomeno di Reynaud), epatiche (cirrosi micronodulare) e renali (insufficienza renale). TREX 1 codifica per una esonucleasi implicata nella degradazione del DNA.

Altri disordini monogenici possono condurre ad ischemia cerebrale per interessamento delle grandi arterie intra- o extracraniche, ad es. la sindrome di Ehler-Danlos tipo IV, la sindrome di Marfan e lo psudoxantoma elastico possono complicarsi con ictus a mezzo della dissecazione dei grandi vasi cerebroafferenti o intracranici.

La sindrome di Marfan è la più frequente di queste condizioni, con un'incidenza di 1 caso ogni 10 000 nella maggior parte delle razze e dei gruppi etnici²⁷. I pazienti presentano un habitus caratteristico, longilineo con dolicoftenomelia, ed anomalie oculari caratteristiche che possono indirizzare la diagnosi clinica (lussazione del cristallino). La maggiore fonte di morbilità è legata alle alterazioni cardiovascolari: il prolasso della mitrale evolutivo verso una grave insufficienza valvolare, e la dilatazione della radice aortica e dei seni di Valsalva, che può condurre alla dissecazione dell'aorta e delle sue arterie tributarie. Una caratteristica neurologica peculiare di questa condizione, anche se generalmente asintomatica, è l'ectasia del sacco durale midollare. Da un punto di vista molecolare la sindrome è legata nella maggior parte dei casi a mutazioni del gene della fibrillina sul cromosoma 15, anche se la diagnosi è essenzialmente di tipo clinico.

Il termine omocistinuria si riferisce ad un'aumentata escrezione urinaria della forma ossidata della cistina, ovvero l'omocisteina. L'omocistinuria classica è una condizione autosomica recessiva, legata al deficit di cistationina beta-sintetasi, codificata sul cromosoma 21, ed è caratterizzata da elevati livelli plasmatici della omocisteina e del suo metabolita, la metionina. Accanto alla forma classica esistono varianti in cui l'iperomocisteinemia non è accompagnata

da ipermetioninemia, che sono causate da errori del metabolismo situati nei meccanismi di conversione dell'omocisteina in metionina, come il deficit nella metiltetraidrofolato-reduttasi e nel metabolismo della cobalamina. L'omocistinuria classica ha una prevalenza compresa tra 1 caso per 58 000 ed 1 caso per 1 000 000, esiste dunque una certa variabilità nella sua frequenza in relazione ai diversi studi²⁸. Il fenotipo è caratterizzato da un habitus marfanoide, una diminuita pigmentazione di cute e capelli, e l'ectopia del cristallino. Se non trattata si complica con disturbi psichiatrici, crisi epilettiche e eventi tromboembolici tra cui l'ischemia cerebrale in età molto precoce (20-30 anni). Il meccanismo con cui l'elevazione dell'omocisteina conduce a ictus è molteplice, comportando da una parte l'attivazione dell'aterosclerosi dei grossi vasi mediante meccanismi di stress ossidativo²⁸, dall'altra uno stato procoagulativo del sangue che favorisce anche la malattia e l'occlusione dei piccoli vasi intracranici²⁹. Sono stati inoltre osservati ictus da dissecazione vascolare ed un'arteriopatia analoga a quella della fibrodisplasia muscolare³⁰⁻³¹.

La MELAS (Mitochondrial myopathy, Encefalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes) è un'altra rara condizione ereditaria e progressiva che deve essere messa nella diagnostica differenziale dell'ictus giovanile³². Non presenta una particolare predilezione etnica, e la prevalenza è compresa tra 8 casi per 100 000 in Inghilterra e 236 casi per 100 000 in Australia. È trasmessa nella gran parte dei pazienti per via matrilineare (nell'80% dei casi è presente una mutazione in posizione 3243 del mtDNA codificante per il tRNA della leucina), anche se sono descritti casi a trasmissione mendeliana, tramite il DNA nucleare. Il paziente ha inizialmente uno sviluppo regolare, che si complica (tipicamente prima dei 40 anni di età) con la comparsa di episodi stroke-like. L'eziologia di questi episodi non è stata completamente compresa. Le immagini di RMN in DWI eseguite nel corso dell'episodio ischemico documentano lesioni corticali multifocali laminari, compatibili con edema vasogenico, che non seguono un territorio vascolare preciso e mostrano una predilezione per

le aree cerebrali posteriori³³. Inizialmente si riteneva che queste lesioni fossero espressione di una angiopatia dei piccoli vasi legata alla disfunzione dei mitocondri, ma la documentazione di alterazioni in DWI compatibili con edema vasogenico e non citotossico, e il riscontro SPECT di iperemia dei territori coinvolti, hanno fatto emergere altre ipotesi. Attualmente si ritiene che il deficit neurologico focale sia la conseguenza di un'insufficienza nel metabolismo energetico del neurone, che innescherebbe meccanismi di citotossicità, iperperfusionemica ed edema vasogenico³⁴. Da un punto di vista clinico gli episodi *stroke like* sono abitualmente associati ad emicrania e crisi epilettiche, fenomeni entrambi espressione di un'iperexcitabilità neuronale forse conseguente ad alterazioni dell'omeostasi extracellulare per disfunzione della barriera ematoencefalica. I sintomi extra-neurologici sono molteplici e comprendono: bassa statura, intolleranza all'esercizio fisico, miopatia, neuropatia periferica, perdita di udito, atrofia del nervo ottico, retinopatia pigmentosa, oftalmoplegia, cardiomiopatia dilatativa o ipertrofia ventricolare sinistra, anomalie del ritmo cardiaco, nefropatia, disfunzione intestinale, vomito, diabete mellito. La diagnosi si fonda principalmente su un alto sospetto clinico, supportato da test di laboratorio e dalla biopsia muscolare. I pazienti hanno aumentati livelli di lattato e piruvato ed un aumentato rapporto lattato/piruvato nel siero, anche se talvolta le anomalie si identificano solamente nel liquor. La biopsia muscolare è il test diagnostico più utile, con identificazione delle tipiche *red ragged fibers* alla colorazione tricromica modificata di Gomori, e della reazione fortemente positiva alla succinico-deidrogenasi, test altamente specifico per MELAS. L'analisi molecolare del mtDNA può aiutare o completare l'iter diagnostico.

Pur essendo state sinteticamente trattate solamente alcune delle più frequenti patologie associate ad ictus ischemico giovanile, da questa breve esposizione già si evince che il percorso della diagnosi e della diagnosi differenziale dell'ictus ischemico nel giovane adulto è delicato e complesso. Il medico che affronta questo tipo di paziente dovrà ricercare in modo

sistematico i fattori di rischio e le cause più “tradizionali” di ictus ischemico, ma in una significativa percentuale di casi si troverà dinnanzi a pazienti con fattori di rischio atipici o assenti, e in circa il 50% dei pazienti non potrà trovare una spiegazione dell’ischemia cerebrale in uno dei 3 meccanismi patogenetici più classici, ovvero l’aterosclerosi dei grandi vasi, la cardioembolia, la malattia del piccolo vaso su base ipertensiva. Con l’eccezione della dissecazione vascolare, l’insieme delle altre cause identificabili di ictus nel soggetto giovane adulto è costituito da patologie rare, di natura infettiva, disimmune, genetica, la cui diagnosi è spesso difficoltosa. Data la specificità del percorso di identificazione delle singole patologie, i costi e la necessità di esami invasivi, ad es. biotipici, l’esecuzione sistematica nel corso del ricovero ospedaliero dei test diagnostici necessari alla loro individuazione non risulta applicabile, anche se l’evoluzione tecnologica cui stiamo assistendo renderà verosimilmente possibile in un futuro questo tipo di approccio (ad es. potranno essere utilizzati tecniche di “next generation sequencig” per eseguire contemporaneamente il sequenziamento dell’insieme dei vari geni che sono associati ad ictus ischemico). D’altro canto la rarità delle singole patologie rende veramente difficoltoso il loro riconoscimento su base clinica, ovvero la generazione di un forte sospetto diagnostico che possa indirizzare in una precisa direzione l’iter da eseguire nel paziente. Di fatto in circa 1/3 dei giovani adulti con ictus ischemico non viene identificata nessuna causa specifica. E’ sicuramente possibile che l’alta percentuale di ictus criptogenici sia legata alla presenza di una causa transitoria dell’ischemia cerebrale, ad es. una fibrillazione atriale parossistica. Tuttavia è altrettanto verosimile che in questi pazienti siano presenti condizioni patologiche rare, in una fase ancora non conclamata e completa di espressione del fenotipo clinico, che il percorso diagnostico standard non ha identificato. La possibilità di utilizzare delle terapie specifiche, in grado di modificare il decorso della malattia di base, come avviene per le malattie su base autoimmunitaria ma anche per alcune malattie su base genetico-metabolica, ad es. la malattia di Fabry e l’omocistinuria, dovrebbe

essere un criterio aggiuntivo di motivazione del medico alla conoscenza e corretta diagnosi di queste condizioni patologiche.

In questo contesto nasce il progetto di ricerca di questo Dottorato, che è stato incentrato sull'approfondimento delle complicazioni cerebrovascolari in corso di malattia di Fabry.

La malattia di Fabry: generalità

La malattia di Fabry (MF) è un raro disordine del metabolismo dei glicosfingolipidi a trasmissione *X-linked*, che consegue al deficit di attività dell'enzima lisosomiale α -galattosidasi A (α -GAL A)³⁵⁻³⁶.

A seguito dell'assenza o della significativa riduzione dell'attività di questo enzima si assiste ad un progressivo accumulo di glicosfingolipidi neutri (come Gb3 e lyso Gb3) nei lisosomi di vari tipi cellulari, incluse le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce della parete dei vasi.

Il deposito di sfingolipidi agisce con un duplice meccanismo patogenetico: da una parte conduce ad un danno microvascolare di tipo ischemico a livello dei vari organi e tessuti, dall'altra ad una disfunzione primitiva del tessuto per danno cellulare da accumulo, ad es. a livello renale (podociti, cellule tubulari, mesangiali), cardiaco (miocardiociti, fibroblasti valvolari, cellule specializzate del sistema di conduzione) e dei nervi.

Tuttavia, diversamente da altre malattie lisosomiali, la maggior parte dei pazienti rimane per lungo tempo asintomatica durante i primi anni e talvolta decenni di vita³⁷.

Una terapia enzimatica sostitutiva (ERT: enzyme replacement therapy) specifica per la MF, è stata introdotta recentemente e l'outcome a lungo termine di tale trattamento è tutt'ora oggetto di studio.

Epidemiologia:

La MF è un disordine panetnico ed ubiquitario, ma, come per le altre malattie rare, l'identificazione accurata della sua frequenza è difficile.

L'incidenza riportata nella popolazione generale varia da 117 000³⁸ a 476 000³⁹; tuttavia screening condotti su popolazioni di neonati hanno rilevato una prevalenza della patologia

inaspettatamente più alta sia in Italia (1:3100)⁴⁰ che in Taiwan (1:1500)⁴¹ (nei maschi). Le significative differenze tra i dati estrapolabili dalla popolazione generale e quelli inerenti gli screening sistematici condotti su neonati sembrano principalmente ascrivibili all'individuazione di mutazioni associate ad attività enzimatica residua ridotta (non assente) e quindi responsabili di fenotipi clinici più lievi.

L'aspettativa di vita dei pazienti con MF è ridotta sia nei maschi (20 anni) che nelle femmine (10 anni), a seguito di complicanze renali, cardiache e cerebrovascolari.

Manifestazioni cliniche:

Nei soggetti di sesso maschile, emizigoti per il gene mutato, sono stati descritti due fenotipi clinici di malattia: il fenotipo classico, associato ad attività enzimatica assente o pressoché assente, ed il fenotipo atipico o *late onset*, associato ad attività enzimatica residua ridotta.

La **forma classica** della malattia insorge generalmente in età pediatrica.

Le manifestazioni cliniche più precoci sono le acroparestesie dolorose, espressione di una neuropatia dolorosa delle piccole fibre nervose (sia somatiche che autonome) e generalmente evocate dai cambiamenti di temperatura corporea o ambientale, e l'angiocheratoma corporis, una lesione cutanea costituita da grappoli di piccole lesioni rilevate con colorazione variabile da rosso vivo a vinaccia che sono visibili preminentemente nella cosiddetta zona del "costume da bagno" (inguine, radice delle cosce, scroto), nella regione periombelicale, a livello della mucosa orale e delle labbra. Nella esperienza del Centro di riferimento della MF di Firenze⁴² questi due sintomi insorgono rispettivamente nel 72% (età media di esordio 11 anni) e nell'88% dei pazienti.

In merito alle acroparestesie dolorose sono stati descritti due tipi di dolore: crisi dolorose episodiche, dette anche "crisi di Fabry", caratterizzate da dolore urente, agonico, localizzato

alle estremità e con irradiazione agli arti e in altre parti del corpo, e un dolore ad andamento più cronico, caratterizzato da dolore urente e parestesie a formicolio⁴³. Le crisi di Fabry possono essere precipitate dalla febbre, dall'esercizio fisico, dallo stress e da cambiamenti repentini della temperatura. Quando le crisi sono scatenate o accompagnate dalla febbre, i pazienti generalmente hanno una elevata velocità di eritrosedimentazione. In conseguenza del dolore la qualità di vita di questi pazienti è assai limitata⁴⁴⁻⁴⁵. Il danno autonomo, in associazione ad un primitivo coinvolgimento delle ghiandole sudoripare, è causa frequente di ipo-anidrosi: si tratta di un problema importante per i pazienti e può causare riduzione della termodispersione (ipertermia cutanea) con intolleranza a esercizio fisico anche moderato⁴⁶. Altre manifestazioni cliniche precoci di malattia sono i disturbi gastrointestinali, spesso non adeguatamente indagati e caratterizzati (i pazienti possono lamentare dolore addominale, spesso postprandiale, diarrea, nausea e vomito) ed uditivi-vestibolari (il tinnito può essere un sintomo precoce e la perdita di acuità uditiva, spesso riportata fin dai bambini, può presentarsi come ipoacusia cronica e progressiva da accumulo di glicosfingolipidi nel nervo stato-acustico o come sordità improvvisa).

Accanto a queste manifestazioni cliniche si sviluppano a partire dall'infanzia-adolescenza alcune complicazioni asintomatiche, che pertanto possono essere diagnosticate incidentalmente, a seguito di indagini eseguite per altri motivi, o su sospetto clinico mirato. Le più importanti sono la cornea verticillata, termine con cui si descrive un particolare aspetto della cornea, conseguente a depositi spiraliformi di glicosfingolipidi, e facilmente individuato mediante esame con lampada a fessura, e la microalbuminuria-proteinuria, espressione di iniziale coinvolgimento renale.

Nei maschi adulti compaiono le complicanze a carico degli organi vitali, tra cui quelle cerebrovascolari, (TIA ed ictus ischemico) che insorgono in genere a partire dalla terza decade, quando ancora il coinvolgimento di cuore e rene non è ancora sintomatico. Le complicazioni cerebrovascolari saranno oggetto di descrizione dettagliata in una successiva

sezione di questa introduzione. Gli altri organi affetti in misura importante nell'età adulta sono rene, cuore, apparato respiratorio, osso ed occhio.

Il danno renale spesso inizia con microalbuminuria e proteinuria nella seconda e terza decade di vita che, come nella nefropatia diabetica, si ritiene possa direttamente contribuire nella progressione della nefropatia di Fabry⁴⁷. Con l'avanzare dell'età, la proteinuria peggiora. Si sviluppa isostenuria, accompagnata da alterazioni nel riassorbimento tubulare, secrezione ed escrezione. Inizialmente una compensazione glomerulare, con l'iperfiltrazione, può mascherare il danno crescente ma, una volta danneggiato un numero critico di nefroni, la funzionalità renale andrà progressivamente a peggiorare. Dalla terza alla quinta decade di vita, generalmente si sviluppa l'azotemia. In questo stadio, fibrosi, sclerosi e atrofia dei tubuli portano all'insufficienza renale che generalmente intercorre nei maschi attorno alla quarta-quinta decade di vita⁴⁸.

Gli aspetti nefrologici della malattia sono quelli che maggiormente contribuivano alla morbilità e mortalità in epoca pre-ERT. La progressione fino all'insufficienza renale terminale è la prima causa di morte nei pazienti maschi non trattati, e la morte avviene per condizione uremica, sebbene sia praticata la dialisi e/o il trapianto renale⁴⁹.

Significative complicazioni cardiache si sviluppano nel 40-60% dei pazienti⁴⁹⁻⁵², generalmente a partire dalla quarta decade.

Le aritmie e i difetti nella normale variabilità di frequenza cardiaca derivano dal coinvolgimento del nodo del seno, del sistema di conduzione e dal disequilibrio fra tono simpatico e parasimpatico. Cambiamenti del tracciato con anomalie elettrocardiografiche sono frequenti ed includono cambiamenti nella ripolarizzazione (da ipertrofia del ventricolo sinistro), quali un sotto-slivellamento del tratto ST e una inversione dell'onda T⁵³. Altre modificazioni comprendono un intervallo PR corto (<0,12 sec)⁵⁴ dovuto ad una onda P corta, l'allargamento del complesso QRS ed un prolungato intervallo QT, la tachicardia

sopraventricolare intermittente, il blocco del nodo AV, bundle branch block e aritmie, tra cui la fibrillazione atriale e la tachicardia ventricolare non sostenuta^{49-51, 55}.

I cambiamenti strutturali del ventricolo sinistro, particolarmente l'ipertrofia ventricolare concentrica, sono particolarmente frequenti nei pazienti con MF e possono essere dimostrati usando l'ecocardiografia o la Risonanza magnetica cardiaca⁴⁹. È particolarmente importante la misura dello spessore del setto poiché la parete posteriore con l'età si assottiglia.

L'ipertrofia concentrica è stata riportata come il più comune cambiamento strutturale a livello cardiologico della MF.

Nonostante tali modificazioni morfologiche, comunque, la funzione sistolica appare per lo più conservata se misurata con metodiche tradizionali^{49-50,56-59}. La cardiomiopatia ipertrofica è caratterizzata da riduzione della contrazione miocardica e velocità di rilassamento tissutale, talvolta visibili prima dello sviluppo della ipertrofia vera e propria.

Due terzi dei pazienti con ipertrofia del ventricolo sinistro la presentano anche nel destro⁶⁰.

Il coinvolgimento del ventricolo destro è dunque comune ed evolve nella disfunzione diastolica severa. Ciò può spiegare come pazienti con funzione ventricolare sinistra conservata possano sviluppare caratteristiche cliniche come una ridotta capacità di praticare esercizio fisico, organomegalia e linfedema⁶⁰.

L'ischemia miocardica e l'infarto possono svilupparsi nel contesto della compromessa funzione delle arterie coronarie o per effetto di un danno del microcircolo coronarico⁶¹⁻⁶².

Con l'età si sviluppa una fibrosi miocardica progressiva con le componenti interstiziale e di sostituzione. Quella di sostituzione inizia nella parete postero-laterale nel miocardio centrale. Nelle fasi terminali la fibrosi ha sostituito il tessuto cardiaco (fibrosi trasmurale) e gradualmente riduce la funzione cardiaca fino ad arrivare allo stadio di uno scompenso cardiaco congestizio⁵⁶⁻⁵⁸.

Per quanto riguarda il coinvolgimento valvolare, nonostante studi abbiano riportato una elevata incidenza di prolasso della mitrale⁶³ questo dato non è stato confermato da studi

più recenti⁶⁴.

La patologia è associata con un incrementato rischio di sviluppare una dilatazione della radice dell'arco aortico; tale reperto è stato descritto in 24% di 71 maschi emizigoti ed è stata associata statisticamente con la presenza di una arteria basilare dolicoectasica³⁵.

Il coinvolgimento dell'apparato respiratorio si manifesta con dispnea nell'esercizio fisico, tosse cronica ed è presente nel 61% degli uomini affetti da MF⁶⁵.

Un aspetto comune e scarsamente studiato della MF è l'osteopenia/osteoporosi, che può complicarsi con fratture spontanee⁶⁶.

A livello oculare, oltre alla già citata distrofia dell'epitelio corneale (cornea verticillata), che può essere anche derivata da terapia con amiodarone o cloroquina⁶⁷ è frequentemente presente una tortuosità dei vasi congiuntivali retinici da moderata a marcata. Né la distrofia corneale, né le lesioni congiuntivali vanno a compromettere l'acuità visiva; tuttavia, una perdita acuta della vista può essere causata da una occlusione unilaterale della arteria centrale retinica⁶⁸. La cataratta subcapsulare anteriore e posteriore è inoltre descritta, detta "cataratta di Fabry", è il segno oculare patognomonic della patologia⁶⁸.

Il **fenotipo atipico** di MF è detto anche *late onset*, in quanto le manifestazioni precoci e più specifiche di malattia (acroparestesie dolorose, anidrosi, angiocheratoma corporis, disturbi gastrointestinali) sono generalmente assenti. Questo fenotipo è diagnosticabile in maschi che presentano intorno alla quarta, quinta decade di vita, manifestazioni confinate ad un solo organo o sistema, ad es. il cuore (variante cardiaca) ed il rene (variante renale). Al contrario dei soggetti affetti dalla forma classica, vi è un'attività enzimatica residua che varia dal 2% al 20% del normale⁶⁹⁻⁷⁰.

La variante cardiaca è quella maggiormente descritta e include manifestazioni quali cardiomegalia, anomalie elettrocardiografiche, cardiomiopatia, cardiomiopatia ipertrofica non ostruttiva e infarto del miocardio; può talvolta essere rilevata una lieve proteinuria⁷¹⁻⁷².

La variante renale è stata identificata fra pazienti dializzati o con danno renale end-stage in Giappone⁷³. I pazienti avevano un'attività enzimatica praticamente nulla. Un controllo precoce nei pazienti con malattia renale è dunque essenziale.

Si intendono col termine di varianti intermedie i casi di pazienti in cui, in assenza di segni e sintomi infantili e adolescenziali, attorno ai 40 anni si sviluppa un quadro di cardiomiopatia ipertrofica con successiva comparsa di danno renale end-stage⁷⁴.

Il fenotipo clinico delle **femmine**, eterozigoti per il gene mutato, può essere compreso tra la completa assenza di malattia e la presenza di un quadro grave e sovrapponibile al fenotipo maschile classico. Tradizionalmente si considerava che i soggetti eterozigoti non sviluppassero sintomi e che le donne fossero esclusivamente delle “carrier” ovvero portatrici sane del gene implicato.

Un crescente numero di pubblicazioni e lo sviluppo delle conoscenze circa il corso naturale della patologia aveva invece indicato che il termine X-linked recessivo dovesse essere abbandonato e che la MF debba essere descritta come “ereditarietà X-linked”⁷⁵.

L'eterogeneità fenotipica nel sesso femminile è da imputare al fenomeno di Lyonizzazione⁷⁶, in cui una delle copie del cromosoma X viene inattivato in modo casuale all'interno delle cellule dell'embrione. Le donne Fabry sono essenzialmente un mosaico di cellule normali e con mutazione in proporzioni variabili, e se la proporzione delle cellule portatrici della mutazione è preponderante rispetto alle cellule normali, il soggetto presenterà sintomi con maggiore probabilità.

Una elevata percentuale di donne sviluppa danno d'organo che coinvolge in maggior misura il cuore, e meno, il rene, circa un decennio più tardi rispetto ai maschi affetti⁷⁷. In merito alle complicazioni cerebrovascolari, sia la nostra esperienza⁶² che i dati della letteratura⁷⁸⁻⁷⁹ riportano una sostanziale “parità di genere”, essendo esse ugualmente presenti tra donne e uomini.

Eziopatogenesi

La malattia di Fabry è una patologia trasmessa come un disordine *X-linked*. Il gene responsabile è collocato nel braccio lungo del cromosoma X nella posizione Xq22.

Il gene, denominato GLA, consiste di 7 esoni, con 12,436 paia di basi.

La MF può essere causata da una grande varietà di mutazioni puntiformi

missense e nonsense, di *splicing*, piccole delezioni o inserzioni o ampie delezioni⁸⁰⁻⁹⁵; ad oggi sono state individuate oltre 660 mutazioni⁹⁶, generalmente di tipo privato, ovvero appartenenti ad un'unica famiglia. Ci sono controversie per alcune mutazioni identificate, essendo state rivalutate e considerate da alcuni autori quali polimorfismi rari del gene, in particolare, un acceso dibattito è sorto attorno alla p.Asp313Tyr nell'esone 6⁹⁷.

La struttura tridimensionale dell'enzima α -galattosidasi A umana è stata studiata attraverso la cristallografia a raggi X⁹⁸. È una molecola omodimerica in cui ogni monomero è composto da due domini: i residui aminoacidici 32-328 comprendono il dominio N-terminale (che contiene il sito attivo, costituito da 15 aminoacidi avvicinati nell'assunzione della conformazione tridimensionale del monomero), e i residui 329-421 quello C-terminale.

L'enzima usa un meccanismo con reazione a doppio spostamento, dove due successivi agganci al carbonio anomero del substrato, portano a rompere il legame glicosidico, trattenendo l'anomero del substrato stesso⁹⁹.

L'assenza o la riduzione dell'attività dell'enzima α -galattosidasi A comporta l'interruzione della cascata catabolica dei glicosfingolipidi, con accumulo lisosomiale di globotriaosilceramide (Gb3), sfingosina-Gb3 (Lyso-Gb3) ed altri glicosfingolipidi tra cui quelli che corrispondono a marker dei gruppi sanguigni B e P1. Queste sostanze si accumulano in molti tipi cellulari, ne alterano in maniera complessa il metabolismo ed infine inducono alterazioni strutturali della cellula stessa e dei tessuti fino al sovvertimento della

normale organizzazione e all'insorgenza di fibrosi, causa del passaggio dalla disfunzione dell'organo al danno irreversibile dello stesso.

Il materiale d'accumulo può essere visualizzato alla microscopia ottica (ma solo utilizzando particolari precauzioni necessarie alla colorazione dei lipidi) o elettronica.

Al microscopio ottico l'accumulo di lipidi nel materiale bioptico può essere evidenziato soprattutto con la preparazione a fette semi-sottili colorate con blu di toluidina o con la colorazione tricromica di Masson. La microscopia elettronica è altamente specifica e mostra sia a livello miocardico che renale le inclusioni lipidiche a strati dette "*Zebra bodies*" o figure mieliniche.

Diagnosi

Un esordio precoce dei segni e sintomi della MF esige una diagnosi pronta, soprattutto in funzione della possibilità di un trattamento specifico. Tuttavia il riconoscimento della MF può essere difficile per diversi motivi: le manifestazioni della malattia sono spesso eterogenee, i sintomi possono somigliare a malattie più comuni e i danni renali o cardiaci più gravi sono inusuali nei bambini. L'esperienza clinica conferma che purtroppo esiste un ritardo diagnostico che mediamente si attesta attorno ai 15 anni.

La procedura diagnostica differisce tra maschi e femmine con MF.

La dimostrazione di una scarsa o assente attività enzimatica nel plasma o nei leucociti è la metodica di riferimento e conclusiva nei maschi¹⁰⁰. La determinazione plasmatica può dar luogo occasionalmente a falsi positivi e deve essere confermata dall'analisi leucocitaria¹⁰¹.

Nelle donne, potendo esse a causa della Lyonizzazione presentare un'attività enzimatica normale, deve essere sistematicamente eseguito test genetico¹⁰². L'analisi molecolare diretta è semplice, data la piccola taglia del gene costituito da soli 7 esoni. Poiché il sequenziamento diretto degli esoni nei soggetti di sesso femminile può non riconoscere piccole delezioni, l'uso

della Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) è utile nei casi in cui ci sia una bassa attività enzimatica, non associata all'identificazione di alcuna mutazione¹⁰³.

Il dosaggio del globotriaosilceramide plasmatico è stato proposto come metodica diagnostica, ma richiede molto tempo e non è molto affidabile. Un marker più affidabile, sia nel maschio che nella femmina, è il Gb3 urinario, tuttavia il Gb3 in alcune mutazioni e nelle forme ad esordio tardivo può essere basso¹⁰⁴⁻¹⁰⁵, dando origine a fenomeni di falsa negatività.

Terapia enzimatica sostitutiva

Dal 2001 è disponibile una terapia enzimatica sostitutiva (ERT) specifica per la MF, in due differenti formulazioni; essa è oggetto di farmacovigilanza e molti aspetti, soprattutto riguardanti l'efficacia del farmaco nei confronti di alcune complicazioni della malattia, tra cui le cerebrovascolari, devono essere ancora monitorati negli studi a lungo termine. Le attuali linee guida per l'inizio della terapia variano da un paese all'altro, rimanendo peraltro non conclusive per quanto riguarda i bambini e le donne¹⁰⁶.

In Europa vi sono due preparazioni dell'enzima: l'agalsidasi alfa (Replagal, Shire, Cambridge, MA, USA), che viene prodotto usando colture di fibroblasti umani e registrata per un uso alla dose di 0,2 mg/Kg ogni 15 giorni¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, e l'agalsidasi beta (Fabrazyme, Genzyme, Corp, Cambridge, MA, USA), prodotto dall'espressione del cDNA dell'alfa galattosidasi umana in cellule dell'ovaio di Cavia Cinese (CHO) e registrato per un uso a 1,0 mg/Kg ogni 15 giorni¹¹⁰⁻¹¹¹.

La sicurezza ed efficacia di entrambi questi enzimi è stata testata in trial randomizzati, in doppio cieco, controllati da placebo^{108,112-115} e con estensione degli studi per entrambi i farmaci in gran parte a carico delle industrie farmaceutiche, anche con la creazione di registri internazionali¹¹⁶⁻¹²².

Agalsidase alfa: questo farmaco è stato approvato in 45 paesi per il trattamento della MF, il registro post-marketing di monitoraggio del suo utilizzo è il Fabry Outcome Survey (FOS). Da dati provenienti dagli studi clinici randomizzati e controllati e da questo registro sembra che dopo infusione di agalsidase alfa vi sia un miglioramento dei sintomi clinici precoci, con riduzione del dolore neuropatico e miglioramento della qualità di vita, a partire già dall'età infantile e adolescenziale.

In merito al coinvolgimento di organi maggiori, la funzione renale (misurata tramite GFR e clearance della creatinina) si è mantenuta stabile dopo 1-2 anni di ERT¹¹⁸. Nei maschi affetti al basale da nefropatia allo stadio 1 e 2, tuttavia, la GFR ha continuato a ridursi, anche qualora la proteinuria basale fosse inferiore al grammo¹²³. Nei pazienti in cui la funzione renale era già compromessa ed era presente un peggioramento anche sotto agalsidasi alfa, è stato talvolta effettuato un protocollo di somministrazione del farmaco ogni settimana, e in qualche caso vi è stato un miglioramento¹¹⁶. In una recente metanalisi sembra che la ERT con agalsidasi alfa possa rallentare il declino della funzione renale nei pazienti con nefropatia da lieve a moderata e una proteinuria sotto il grammo/die.

Un miglioramento della funzione cardiaca e in particolare una riduzione nella massa del ventricolo sinistro è stata osservata in donne in ERT con agalsidase alfa da almeno 27 settimane¹²⁴.

Una riduzione nel volume ventricolare medio e del setto è stato evidenziato nei pazienti appartenenti al FOS dopo 1 e 2 anni di trattamento, evidenziando la maggior riduzione nei pazienti con spessore maggiore all'esordio¹¹⁷.

Per quanto concerne l'effetto del farmaco sul sistema nervoso centrale, non emergono invece dati a favore di una sostanziale efficacia del farmaco, essendo stata documentata una progressione della leucoencefalopatia ed una ricorrenza di ischemia cerebrale in una significativa percentuale di pazienti.

Agalsidase beta: questo farmaco è stato approvato in 55 paesi, compresi gli USA¹²⁵.

Studi comprensivi di esame istologico dell'accumulo tissutale, condotti principalmente su rene e cuore, hanno documentato una riduzione della clearance del Gb3 dalle cellule epiteliali renali (podociti, cellule tubulari epiteliali distali), anche se è mai stato possibile evidenziare una clearance completa dai podociti¹²⁶⁻¹²⁷, dopo un trattamento di 4,5 anni.

Nei pazienti adulti con funzione renale alterata al basale, la terapia continuativa con il farmaco conduceva ad un miglioramento solo parziale. Nella maggior parte dei pazienti, dopo 4,5 anni di terapia, proteinuria, GFR, e creatinina sierica rimangono stabili e normali¹¹¹; predittori di peggioramento sembravano essere l'età > 40 anni e la presenza di valori di base di proteinuria >2 g/24ore, ovvero un danno renale da moderato a grave.

A livello cardiaco in uno studio di fase terza 5 mesi di trattamento hanno mostrato una completa eliminazione del Gb3 dalla microcircolazione cardiaca nel 72% dei pazienti trattati, comparato con il 3% dei pazienti trattati con placebo. Il gruppo placebo ha ottenuto gli stessi risultati dopo 6 mesi di trattamento nella estensione di studio open label¹²⁸.

È stata inoltre dimostrata una stabilizzazione e in alcuni casi una riduzione dello spessore del ventricolo sinistro dopo 12 mesi di terapia.

L'efficacia sui sintomi precoci, fra cui il dolore è stata riportata in vari studi¹²⁹⁻¹³⁰.

La qualità di vita, misurata nei pazienti del Fabry Registry tramite la SF-36, è globalmente Migliorata dopo terapia. Non è noto se agalsidase beta possa ridurre o stabilizzare il danno cerebrovascolare¹¹¹.

Comparazione fra i due farmaci

L'efficacia e la tollerabilità tra i due composti^{125,131} sono state comparate in un trial open-label. Lo studio non ha rilevato differenze significative fra i due farmaci quanto a riduzione della massa del ventricolo sinistro o altri parametri della malattia a 12 e 24 mesi di trattamento.

Fallimenti terapeutici sono stati descritti in entrambi i gruppi e sono sembrati correlati all'età

e al grado di avanzamento della MF pre-trattamento¹²⁰, così come descritto negli studi derivanti dai due principali registri¹³²⁻¹³³.

Patologia cerebrovascolare in corso di malattia di Fabry

La patologia cerebrovascolare è, assieme alla neuropatia periferica delle piccole fibre, la principale complicazione neurologica della MF. Essa è ugualmente frequente nei maschi emizigoti e nelle femmine eterozigoti⁷⁸⁻⁷⁹, anche se le prime manifestazioni cerebrovascolari nei soggetti femminili insorgono con un ritardo di 5-10 anni, suggerendo che lo sviluppo della patologia cerebrovascolare possa essere almeno in parte correlato al livello di deficit enzimatico¹³⁴.

Tipologia e meccanismi eziopatogenetici:

I pazienti con MF presentano principalmente complicazioni cerebrovascolari di tipo ischemico. E' noto fin dagli anni '90 che esiste una predilezione per le arterie del distretto circolatorio vertebrobasilare, come dimostrato da studi clinici e anatomopatologici, anche se l'interessamento vascolare è chiaramente presente anche nel distretto circolatorio anteriore¹³⁴. Un'altra caratteristica della MF è data dall'interessamento di tutti i tipi di arteria intracranica, indipendentemente dal calibro, anche se con conseguenze in parte divergenti: le arterie di medio e piccolo calibro presentano infatti una parete marcatamente ispessita ed un lume assottigliato, mentre le più grandi arterie intracraniche sviluppano una dilatazione del lume ed una spiccata tortuosità (dolicoectasia). Come la stenosi dei vasi di calibro minore, anche la dolicoectasia è ritenuta conseguenza dell'accumulo di glicosfingolipidi nella parete vascolare, particolarmente nelle cellule muscolari lisce. Le cellule muscolari lisce sono infatti implicate nella sintesi delle macromolecole che costituiscono la matrice extracellulare (collagene, elastina, glicosaminoglicani e proteoglicani), dalla quale dipendono la forza e l'elasticità della

parete stessa. L'accumulo di glicosfingolipidi, interferendo con la produzione ed organizzazione dei componenti di questa matrice, causerebbe la perdita dell'integrità strutturale della parete arteriosa e quindi la sua progressiva, graduale, dilatazione. Differenze nella composizione della matrice extracellulare potrebbero spiegare la maggiore suscettibilità dei vasi del distretto circolatorio posteriore all'evoluzione dolicoectasica¹³⁴.

In merito alla patogenesi dell'ischemia cerebrale, si ritiene che la dolicoectasia vascolare possa portare ad ictus mediante meccanismi differenti¹³⁴. Innanzitutto, anche a seguito di fenomeni disautonomici ed ipotensivi (anch'essi parte dello spettro fenotipico della MF), può essere responsabile di infarti emodinamici (di confine) legati alla riduzione del flusso ematico. In secondo luogo in caso di marcata dilatazione del vaso (ad aneurisma fusiforme) si possono generare le condizioni predisponenti una trombosi in situ, causa sia di grandi infarti territoriali (ad es. ponto-mesencefalico bilaterale) che di fenomeni di ateroembolia (ad es. nel territorio della cerebrale posteriore). Infine la tortuosità del decorso può comportare lo stretching, la distorsione ed ostruzione delle di per sé già stenotiche arterie tributarie, causando pertanto ischemia di tipo lacunare (ad es. delle arterie penetranti pontine paramediane o circumferenziali). I piccoli infarti lacunari profondi, abitualmente multipli, possono essere anche la conseguenza primaria della progressiva occlusione delle piccole arterie o arteriole intracraniche, secondaria alla deposizione dei glicosfingolipidi neutri nella parete vascolare, e all'azione dei fattori di rischio vascolare classici, quali ad esempio l'ipertensione (i pazienti con MF classicamente sviluppano una malattia renale cronica progressiva che determina ipertensione arteriosa). Uno studio longitudinale¹³⁵, condotto da Crutchfield et al. nel 1998 su 50 maschi emizigoti, aveva rilevato che le prime lesioni a comparire nella MF sono localizzate nei territori delle arterie perforanti lunghe di piccolo calibro, e sono pertanto rappresentate da isolate lesioni della sostanza bianca emisferica e piccoli infarti lacunari a livello dei gangli della base. Secondo questi autori solo con il

procedere dell'età diverrebbe clinicamente significativo l'interessamento delle grandi arterie intracraniche e comparirebbero i più grandi infarti territoriali a sede corticale e patogenesi embolica.

Altri fattori devono essere considerati nell'eziopatogenesi dell'ischemia cerebrale in corso di MF, tra cui l'embolia cerebrale cardiogena e le alterazioni del sangue in senso protrombotico quale conseguenza dell'endoteliopatia da accumulo.

A livello cardiaco i glicosfingolipidi si depositano, oltre che nel sistema vascolare coronarico, all'interno di miocardiociti, fibroblasti valvolari e cellule specializzate del sistema di conduzione cardiaco, causando infarto miocardico, cardiopatia ipertrofica, valvulopatie (soprattutto prolasso mitralico e valvulopatia aortica) ed anomalie del ritmo cardiaco (sia in senso bradicardico che tachicardico), come dettagliato nella precedente sezione⁵⁹. La fibrillazione atriale è presente in circa il 15% dei pazienti con MF, con esordio in genere a partire dalla V decade ed incremento della prevalenza età correlato¹³⁶⁻¹³⁷. Facilmente si deduce che una proporzione non trascurabile degli eventi cerebrovascolari ischemici nella MF, soprattutto nelle età più avanzate, possa conseguire a fenomeni cardioembolici.

Per quanto riguarda il fenotipo pro-trombotico del sangue, in alcuni studi¹³⁸⁻¹⁴² è stato documentato un aumento dei markers di attivazione endoteliale (sVCAM, sICAM, P-selectina, E-selectina, e microparticelle endotelio-derivate), uno sbilanciamento dei fattori della coagulazione in senso pro-trombotico (aumento del PAI, diminuzione della trombomodulina e del TFPI), ed un incremento dell'omocisteina plasmatica che sono solo in parte correlati alla gravità dell'*impairment* renale. Altri fattori implicati sembrano essere uno stato pro-infiammatorio (con incremento dell'interleuchina 6) ed una down-regulation della via dell'ossido nitrico.

I meccanismi coinvolti nella genesi della patologia cerebrovascolare ischemica in corso di MF sono dunque molteplici e tendono ad aggravarsi con il procedere della patologia da accumulo, rendendo complessa la strategia di prevenzione sia primaria che secondaria dell'ictus ischemico.

Sussiste inoltre nei pazienti affetti da MF un certo di rischio di patologia emorragica cerebrale, che però rappresenta una complicazione cerebrovascolare meno frequente.

Sono stati descritti esempi isolati di emorragia a sede subaracnoidea, secondaria alla rottura di un'arteria dolicoectasica, ma soprattutto casi di emorragia intraparenchimale primitiva da rottura di piccolo vaso, correlati da una parte all'ipertensione ed all'insufficienza renale cronica avanzata¹³⁴, dall'altra all'utilizzo delle terapie preventive dell'ischemia cerebrale (anticoagulanti, antiaggreganti)¹⁴³⁻¹⁴⁴. La recente segnalazione neuroradiologica della presenza di Cerebral Microbleeds (CMBs) a localizzazione sottocorticale in una coorte di pazienti affetti da MF, fornisce un tassello utile alla comprensione ed al management di questo fenomeno¹⁴⁵. I CMBs sono infatti un marcatore subclinico delle microangiopatie cerebrali con tendenza al sanguinamento.

Frequenza dell'ictus cerebrale in corso di malattia di Fabry:

Considerata la rarità della MF e la sua eterogeneità clinica, anche in funzione dell'età e del sesso del paziente, risulta in parte difficoltoso determinare in modo univoco la frequenza con cui insorgono le complicazioni cerebrovascolari.

Nel 1990 Morgan et al¹⁴⁶. avevano individuato nella loro serie di pazienti con MF che 3/7 maschi (43%) e 0/5 femmine avevano sofferto di episodi di ischemia cerebrale (ictus o TIA).

Negli anni successivi venne invece documentato che anche le femmine eterozigoti per MF soffrivano frequentemente di coinvolgimento del SNC. MacDermot et al. condussero nel 2001 un esteso studio trasversale, sottoponendo ad un questionario standardizzato i pazienti con MF inseriti negli ultimi 15 anni nel registro nazionale inglese delle malattie genetiche¹⁴⁷⁻¹⁴⁸. Da questo lavoro derivò che 22/98 maschi (22%) e 17/60 femmine (28%) avevano presentato un TIA o un ictus ischemico cerebrale. Uno studio australiano condotto nel 2002 con una simile metodologia¹⁴⁹, riscontrò dati in parte sovrapponibili, documentando che 9/29 maschi (31%) e 2/38 femmine (5%) erano affetti da ictus/TIA, mentre Vedder et al.¹⁵⁰ documentarono nella popolazione olandese di pazienti con MF una frequenza di 12/48 maschi (48%) e di 13/50 femmine (32%), (utilizzando però dei criteri diagnostici sia clinici che radiologici, ovvero includendo oltre ai “Cerebrovascular accidents” i “lacunar infarctions” silenti visti alla RMN encefalo).

Dati di prevalenza leggermente inferiori provengono dai registri osservazionali multicentrici sponsorizzati dalle compagnie farmaceutiche dopo la commercializzazione della terapia enzimatica sostitutiva. Nel 2009 Sims et al. ha riportato i dati inerenti la storia naturale (ovvero precedenti all’inizio della terapia enzimatica con agalsidase beta) delle complicazioni cerebrovascolari dei pazienti inseriti nel Fabry Registry¹⁵¹. L’autrice riporta che 86/1243 maschi (6,9%) e 52/1203 femmine (4,3%) soffrivano di ictus cerebrale, che nell’87% dei pazienti si trattava di un ictus di tipo ischemico e che le emorragie cerebrali erano prevalenti nel sesso maschile¹⁵¹. La prevalenza dell’ictus ischemico estrapolabile dal Fabry Outcome Survey (FOS) alla data di marzo 2005¹⁵² era di 50/330 maschi (15%) e 41/358 femmine (11%). I dati provenienti da questi registri sembrano dunque indicare tassi di prevalenza minori, ma non può essere esclusa una sottostima del fenomeno, data la natura “volontaria” dei registri, ed il fatto che spesso i compilatori non sono neurologi (ma altri medici specialisti).

E' pertanto verosimile che le informazioni più accurate provengano dai più piccoli studi precedentemente discussi, e che quindi l'ictus cerebrale complichino circa il 25% dei pazienti con MF, ed in proporzioni sostanzialmente analoghe nei due sessi.

In merito alla tipologia dell'ictus cerebrale, vi sono poche informazioni disponibili, che provengono principalmente dal Fabry registry. Come precedentemente detto in questo registro l'87% degli ictus aveva natura ischemica, e di questi circa il 70% (38/54 pazienti per cui il dato era riportato) derivava dall'occlusione di un piccolo vaso, con localizzazione prevalente nel territorio circolatorio anteriore (solo il 18% delle lacune era a sede vertebrobasilare) ed assenza di differenze di distribuzione tra i due sessi¹⁵¹. Tuttavia data la non trascurabile quantità di dati missing (queste informazioni erano disponibili solo per 54/126 ictus ischemici) questi dati necessitano di ulteriore conferma.

Reperti neuroradiologici in corso di malattia di Fabry:

Il più frequente reperto neuroradiologico in corso di MF è rappresentato dalla progressiva leucoencefalopatia (o White matter lesions: WMLs), con esordio a partire dalla seconda decade di vita (anche se sono presenti segnalazioni di leucoencefalopatia già in età infantile)¹⁵³. Dal precedentemente citato studio di Crutchfield et al¹³⁵, emerge che il 52% dei pazienti, ad un'età media di 33 anni, mostra le WMLs, le quali sono presenti nella totalità dei pazienti con più di 55 anni. Le WMLs sono state documentate anche in pazienti ancora asintomatici dal punto di vista cerebrovascolare, precedendo quindi lo svilupparsi dell'ictus ischemico in corso di MF^{78, 154}. Inoltre dati provenienti da uno studio multicentrico trasversale italiano (Firenze, Monza, Milano, Rimini, Pisa, Livorno, Ortona, Padova, Chieti, Roma) sembrano suggerire che l'estensione della leucoencefalopatia alle aree sottotenzoriali sia correlata ad una fase più avanzata di malattia⁷⁸, anche se non sono disponibili dati di follow

up longitudinale dei pazienti esaminati. Studi più recenti hanno utilizzato analisi *voxel based* del “*Diffusion Tensor Imaging*” alla RMN strutturale dell’encefalo di pazienti affetti da MF; Albrecht et al. nel 2007¹⁵⁵ hanno documentato un significativo incremento della “*Mean Diffusivity*” (MD) della sostanza bianca in una serie di giovani pazienti Fabry (N. 25+ 20 controlli; età media 36 anni). La MD rappresenta in risonanza magnetica un indicatore dell’integrità ultrastrutturale del parenchima cerebrale (incremento nel contenuto di acqua interstiziale e rarefazione della mielina); in questo lavoro tale alterazione si presenta precocemente in aree rifornite dalle arterie perforanti lunghe, e rappresenta un marcatore più precoce dell’ipertintensità sulle immagini T2 pesate del coinvolgimento della sostanza bianca cerebrale. Nel 2013 Paavilainen et al.¹⁵⁶ hanno confermato queste osservazioni in un ulteriore studio caso-controllo su 12 pazienti con MF (13 controlli) con un’età media di 38 anni, documentando inoltre una riduzione nella “*Fractional anisotropy*” (FA) a livello di ponte, tratti corticospinali, emisferi cerebellari, talami, capsula interna ed esterna, corpo calloso e sostanza bianca parietale. La FA è indicatore in risonanza magnetica del grado di allineamento delle molecole contenute nelle fibre nervose, e ne rispecchia quindi l’integrità funzionale. Esistono ancora incertezze sulla patogenesi delle WMLs in corso di MF. Nel 2003 Moore et al.¹⁵⁷ (sulla base di uno studio caso-controllo condotto su 16 MF + 7 controlli sani) ipotizzarono che tali lesioni si sviluppassero in aree cerebrali profonde ipometaboliche (diminuito metabolismo regionale del glucosio alla PET cerebrale) ed iperperfuse, come ad indicare che le WMLs originassero da una insufficienza metabolica della sostanza bianca che causava una dissociazione tra metabolismo cellulare e perfusione tissutale. Questa ipotesi è stata tuttavia messa in discussione da altri autori¹⁵⁸ che hanno riscontrato nei pazienti con MF una diminuzione del flusso ematico cerebrale al doppler transcranico, dato che avvicinerrebbe la patogenesi delle WMLs nella MF al modello corrente di sviluppo della leucoencefalopatia, in cui l’ipoperfusione cronica cerebrale risulta la condizione necessaria allo sviluppo delle WMLs.

La dilatazione e tortuosità delle arterie intracraniche è, come precedentemente discusso, un altro reperto caratteristico e frequente in corso di MF, ed è stato oggetto nel 2009 di un interessante studio volto ad identificare quale, tra una serie di misure di RMN, potesse essere la più utile a discriminare i pazienti con MF rispetto ai controlli sani¹⁵⁹. Sorprendentemente il carico di WMLs (volumetria semiquantitativa) non è risultato un utile discriminante tra 25 pazienti con MF (età media: 36 anni; maschi: 10) e 20 controlli sani. I pazienti Fabry presentavano un volume complessivo (medio) di WMLs superiore ai controlli soprattutto a causa dell'inclusione nel computo di un piccolo sottogruppo di casi con alto carico lesionale, ma la differenza non risultava statisticamente significativa. Anche i controlli presentavano infatti un grado lieve di leucoencefalopatia, nonostante la giovane età. Le misure di RMN più utili alla diagnosi risultavano invece la MD globale, più alta nei Fabry (p 0.041) e soprattutto la stima dei diametri dei vasi intracranici. Con l'eccezione del diametro dell'arteria cerebrale anteriore, tutti i diametri delle arterie del poligono di Willis risultavano significativamente superiori nei Fabry rispetto ai controlli, tuttavia era proprio il diametro dell'arteria basilare a presentare il maggior potere discriminativo (3,3 mm vs 2,4 mm, p < 0.0005), anche nei pazienti con età più giovanile (20-36 anni). La misura di questo diametro era stata ottenuta tramite una media di 3 misure (diametro inferiore = subito dopo la confluenza delle vertebrali, medio e superiore = appena prima della biforcazione). L'accuratezza del test è stata stimata attorno all'87%, con una sensibilità del 95% e una specificità dell'83%. In un successivo lavoro¹⁶⁰ gli stessi autori hanno poi osservato che il diametro dell'arteria basilare era un utile discriminante di MF anche nei confronti di una serie di controllo affetta da ictus ischemico cerebrale (accuratezza 86%; sensibilità 84%; specificità 88,5%); tuttavia in questo caso la sensibilità del test, moderatamente elevata, non può consentire di utilizzarlo come strumento di screening della popolazione dei pazienti con ictus da inviare all'analisi biochimico-molecolare.

Il “segno del pulvinar” è un reperto neuroradiologico, identificabile alla RMN encefalo con sequenze assiali T1-pesate come un’iperintensità bilaterale e simmetrica della regione laterale dei pulvinar talamici. E’ stato inizialmente descritto in 7 di 10 pazienti con MF studiati sistematicamente con RMN encefalo da Takanashi et al. nel 2003¹⁶¹, e venne pertanto inizialmente ritenuto un marcatore radiologico piuttosto sensibile. Altri disordini neurologici sono stati associati ad iperintensità del pulvinar nelle sequenze T1-pesate (l’asfissia profonda, il parkinsonismo post-anossico, l’encefalopatia acuta necrotizzante, la malattia di Tay-Sachs e la malattia di Krabbe), ma risultano facilmente differenziabili sulla base dei dati clinici dalla MF. L’iperintensità del pulvinar descritta nella malattia di Creuzfeldt-Jacob è invece un fenomeno distinto, essendo visibile solo nelle sequenze T2-pesate. Pochi mesi dopo la pubblicazione di Takanashi et al, Moore e collaboratori¹⁶² analizzarono retrospettivamente 94 RMN di pazienti con MF afferiti presso il loro centro tra il 1994 ed il 2002 individuando il segno del pulvinar nel 23% dei pazienti circa e documentando che la sua frequenza aumentava con l’età arrivando a coprire il 30% dei casi con > 50 anni di età. Il dato di frequenza individuato dai primi autori veniva dunque in parte ridimensionato già in questo primo lavoro, e casistiche successive riuscirono a documentare solo frequenze ancora minori (14% in Burlina et al. 2007¹⁶³; 2% in Reisin et al. 2011¹⁴⁵). Per tale motivo il segno del pulvinar, seppur piuttosto specifico di MF, non risulta di fatto utile in ambito diagnostico. Da un punto di vista patogenetico è stato supposto che il segno del pulvinar rifletta la presenza di microcalcificazioni, confermate in alcuni pazienti da iperdensità nella stessa sede alla TC cranio diretta. L’ipotesi è che l’iperafflusso ematico presente a livello del talamo, assieme ad una selettiva vulnerabilità del pulvinar e degli adiacenti nuclei talamici, possa spiegare una calcificazione su base distrofica secondaria¹⁶². A supportare questa patogenesi viene anche la recente osservazione dell’incremento della MD nelle regioni laterali del talamo in pazienti che ancora non presentano un franco segno del pulvinar alle immagini T1 pesate, ad indicare un iniziale danno microstrutturale di queste aree¹⁵⁵.

Concludendo, nonostante l'importante incremento delle conoscenze in ambito neuroradiologico sugli aspetti caratterizzanti la MF (particolarmente in ambito di risonanza magnetica) ad oggi non sono disponibili per questa condizione patologica marcatori radiologici utili a selezionare quale test di screening i pazienti da sottoporre ad indagine biochimico-molecolare. Data la diffusione capillare delle metodiche di RMN, l'individuazione di un simile test risulterebbe assai utile in ambito clinico-assistenziale. Tuttavia la leucoencefalopatia della MF, documentata alle sequenze RMN FLAIR e T2-pesate, presenta delle caratteristiche topografiche piuttosto aspecifiche e, soprattutto nelle fasi iniziali di malattia, è costituita da lesioni isolate e di piccole dimensioni, quindi del tutto sovrapponibili a quelle legate ai fattori di rischio vascolare classici (che sono ampiamente prevalenti anche in corso di MF). Indici di leucoencefalopatia più precoci quali la MD risultano ancora poco utilizzabili, in quanto al momento differenze significative sono state riscontrate solo rispetto a piccoli gruppi di controllo costituiti da volontari sani, mentre il parametro dovrebbe essere utilizzato soprattutto per la diagnosi differenziale in popolazioni già sintomatiche (ad esempio per ictus giovanile), per le quali non sono al momento disponibili informazioni. La misura dei diametri delle arterie intracraniche, particolarmente dell'arteria basilare, sembra allo stato attuale delle conoscenze, il marcatore radiologico più sensibile e specifico per la diagnosi di MF, ma anche in questo caso questa stima presenta una ridotta sensibilità (84%) qualora utilizzato nel contesto di popolazioni già sintomatiche per ictus cerebrale e pertanto non si configura come un test utile a selezionare i pazienti da sottoporre agli esami di conferma diagnostica. Segni quali la dolicoectasia vascolare o il segno del pulvinar devono essere ricercati e riconosciuti in ambito clinico in quanto fortemente correlati alla MF, ma, presentando una gravità età-correlata, risultano di fatto utili prevalentemente in fasi avanzate di malattia, quando altri segni clinici, a carico di apparati distinti dal SNC, hanno ormai fornito segni caratteristici di MF e la risposta alla terapia specifica per MF (terapia enzimatica sostitutiva con agalsidase alfa o beta) è minore.

Clinica dell'ictus cerebrale in corso di malattia di Fabry:

Le informazioni circa la manifestazione clinica della patologia cerebrovascolare che complica la MF sono piuttosto contenute. Nel già citato studio di Mitsias et al. (1996)¹³⁴ veniva revisionata la frequenza con cui si presentavano i differenti sintomi neurologici nei pazienti con questa diagnosi. Nei maschi emizigoti (età media 34 anni) i reperti più frequenti risultavano l'emiparesi (63%), la vertigine (39%), la diplopia (37%), la disartria (30%), il nistagmo (26%), l'emiatassia (21%) e l'atassia del cammino (18%). Nelle femmine eterozigoti (età media 40 anni) i sintomi più caratteristici erano la vertigine (50%), l'atassia (40%), l'emiparesi (40%), la diminuzione del livello di coscienza (40%) e l'emisindrome sensitiva (30%). Molti di questi sintomi sono imputabili a difetto circolatorio in territorio vertebrobasilare, ma, come abbiamo visto, lavori successivi di neuroimaging hanno riscontrato un'alta frequenza di coinvolgimento anche del territorio circolatorio anteriore. L'esperienza ventennale di follow up neurologico della MF condotta presso il Centro di riferimento per la Malattia di Fabry dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi di Firenze, ha condotto il dott. Borsini W, neurologo del team multidisciplinare, alla schematizzazione di tre differenti quadri clinici cerebrovascolari che ricorrono frequentemente nelle famiglie con MF, e che sono state esposti in una monografia che l'autore ha recentemente pubblicato¹⁶⁴. Il primo quadro clinico è il più raro e grave. Comprende giovani, generalmente di sesso maschile, che tra la seconda e la terza decade esordiscono con ictus ischemici in fossa cranica posteriore, e che in pochi anni, a causa del recidivare degli eventi, acquisiscono un decorso rapidamente progressivo fino ad un quadro pseudobulbare grave e mortale. Data la somiglianza clinica con la sclerosi multipla, molti di questi pazienti sono stati sottoposti a rachimetesi diagnostica, con individuazione di segni compatibili con importante alterazione della barriera ematoencefalica, mentre indice di Link e bande oligoclonali sono in genere nella norma. Alcuni autori hanno ipotizzato trattarsi di una

forma di meningite asettica con infarti lacunari¹⁶⁵⁻¹⁶⁶. Data la scarsa risposta di questo quadro clinico a tutte le terapie, specifiche e sintomatiche, sono stati sperimentati sporadicamente anche presso il nostro centro terapie con steroidi ad alto dosaggio in bolo, ma con risultati non soddisfacenti.

Il secondo quadro clinico è costituito da ictus ischemici lacunari, generalmente con buon recupero funzionale (ovvero con disabilità minima o assente al momento della dimissione) che insorgono talvolta contemporaneamente all'esordio dell'insufficienza renale nel maschio. Questo quadro è osservabile anche nelle donne, con un esordio però più tardivo. Il ricorrere degli eventi lacunari conduce alla progressiva comparsa di disabilità, che però sopraggiunge nella quinta-sesta decade e presenta un decorso più lentamente progressivo.

Il terzo quadro clinico è invece quello comprendente ictus a patogenesi embolica che si sviluppano prevalentemente in soggetti di sesso femminile, con oltre 50 anni di età, affetti da cardiopatia ipertrofica e fibrillazione atriale. Si tratta di un quadro clinico più invalidante del precedente anche se ad esordio più tardivo e meno frequentemente rappresentato.

I Sezione sperimentale:

**Screening per la malattia di Fabry in giovani adulti
affetti da ictus ischemico cerebrale**

Frequenza della malattia di Fabry in una serie continua di giovani adulti con patologia cerebrovascolare ischemica acuta, ricoverati presso la Stroke Unit e Neurologia ed i reparti di Neurologia 1 e 2 dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

Background ed obiettivo del progetto:

La Malattia di Fabry (MF) è una rara patologia da accumulo a trasmissione *X-linked*, che consegue alla carenza dell'idrolasi lisosomiale α -galattosidasi A (α -GAL A) codificata dal gene GLA sul locus Xq22³⁵⁻³⁶. Ad oggi sono state descritte più di 660 mutazioni⁸⁰⁻⁹⁶, la maggior parte delle quali di tipo “privato”¹⁶⁷, ovvero specifiche di un’unica famiglia. La carenza di α -GAL A è responsabile del progressivo accumulo di glicosfingolipidi neutri nei lisosomi di diversi tipi cellulari, e particolarmente delle cellule endoteliali e muscolari lisce della parete dei vasi di tutto l’organismo³⁶. Come discusso nella sezione introduttiva di questa tesi, l'ictus ischemico è una grave e disabilitante complicazione della MF e generalmente insorge in età giovanile, sia in conseguenza del coinvolgimento primario dei vasi cerebrali, che come complicazione della malattia cardiaca^{134, 151-152}. L'ictus è inoltre frequentemente il primo evento che conduce i pazienti con MF all’attenzione del medico¹⁵¹, a meno che i sintomi più precoci della malattia, quali l’angiokeratoma corporis diffusum, le acroparestesie dolorose o la proteinuria non siano stati correttamente diagnosticati durante l’epoca infantile, ed è quindi una prima opportunità per la diagnosi specifica di MF. E' ragionevole attendere un ictus in circa il 25 % dei pazienti Fabry¹⁴⁶⁻¹⁵⁰, anche se due registri internazionali multicentrici, promossi dalle aziende farmaceutiche dopo la commercializzazione della terapia enzimatica sostitutiva (ERT)¹⁵¹⁻¹⁵², hanno documentato prevalenze inferiori.

Date da una parte la disponibilità di una terapia specifica per la MF e dall'altra l'alta percentuale di pazienti con ictus giovanile ad eziologia indeterminata, sono stati condotti a partire dal 2005 alcuni programmi di screening sistematico per la MF in popolazioni affette da ictus giovanile, volti principalmente ad individuare la frequenza della MF in queste coorti. Nel 2005, Rolfs et al.¹⁶⁸ condussero il primo screening in 721 pazienti affetti da ictus criptogenico, identificando la MF nel 4,9 % dei maschi e nel 2,4 % delle femmine . Vennero successivamente pubblicati altri studi di screening, che condussero a risultati contrastanti: in un lavoro retrospettivo condotto da Brouns et al.¹⁶⁹ su 103 pazienti belgi affetti da ictus criptogenico, non fu possibile identificare nessun nuovo caso di MF.

In altri due differenti studi riguardanti pazienti affetti da primo ictus indipendentemente dall'eziopatogenesi dello stesso, il primo condotto da Wozniak et al.¹⁷⁰ su 558 maschi statunitensi ed il secondo condotto da Baptista et al.⁹ su 493 giovani adulti portoghesi, vennero prodotti risultati contrastanti: il dato di prevalenza era infatti rispettivamente dello 0,2% e del 2,4%.

Un quarto screening, condotto sempre da Brouns¹⁷¹, con disegno prospettico, su 1000 pazienti belgi con ictus da qualsiasi eziologia, sia che si trattasse di un primo evento che di una ricorrenza, individuò la MF nell'1% dei casi.

Da queste prime esperienze di screening in ambito cerebrovascolare emergevano alcune questioni irrisolte, innanzitutto sui criteri di arruolamento dei pazienti:

- i. Era utile valutare solamente i pazienti con ictus criptogenico, o piuttosto, data la molteplicità dei meccanismi con cui si sviluppa l'ictus nella MF e l'alta frequenza dei fattori di rischio vascolare in questi pazienti, era più corretto estendere la selezione all'ictus da qualsiasi causa? Le più alte prevalenze di MF del primo lavoro di Rolfs et al.¹⁶⁸ potevano essere in parte legate all'aver ristretto lo screening agli eventi da causa indeterminata, ma questo criterio, pur aumentando "l'efficienza" dello screening, avrebbe potuto escludere dal corretto inquadramento diagnostico pazienti affetti da

MF il cui ictus era considerato cardioembolico o lacunare sulla base della presenza di precisi fattori di rischio.

- ii. Era utile sottoporre ad esame solamente i pazienti con primo ictus, o anche quelli con ricorrenza di ischemia cerebrale?

In questi ultimi lo screening avrebbe condotto infatti ad una diagnosi più tardiva, ovvero in una fase più avanzata di malattia, quando anche l'efficacia della terapia enzimatica sostitutiva era più incerta.

- iii. L'individuazione di una "mutazione" del gene GLA in un contesto di screening sistematico poteva essere considerato un criterio necessario e sufficiente alla formulazione della diagnosi di MF?

Il termine "mutazione" è qui utilizzato nella sua accezione biochimico-molecolare di "variazione di sequenza del gene", e non tutte le variazioni di sequenza identificate nel gene GLA sono di per sé mutazioni patogene, in grado cioè di indurre la malattia.

In tutti gli screening citati^{9,168-171} veniva considerata diagnostica l'identificazione di una "mutazione" del gene GLA (eccetto nel secondo studio di Brouns et al.¹⁷¹, dove poteva essere diagnostica anche la presenza su due distinti prelievi di un significativo decremento dell' α -GAL A nei maschi), in assenza di criteri clinici aggiuntivi. Pur essendo la MF chiaramente conseguente a mutazioni del gene GLA, abbiamo già osservato che la gran parte di queste mutazioni è di tipo privato¹⁶⁷, e che pertanto è molto probabile, sequenziando il gene, incontrare "mutazioni" non precedentemente descritte e il cui significato clinico è pertanto sconosciuto. Inoltre variazioni inizialmente considerate biologicamente significative, come la c.937G > T (p.Asp313Tyr), si sono rivelate, con l'evoluzione delle conoscenze, dei polimorfismi "rari" e dunque non patogeni⁴⁷. Alcuni di questi polimorfismi/variazioni di sequenza del gene di natura clinica sconosciuta sono stati inclusi nel computo della

prevalenza della MF nelle popolazioni di ictus giovanile di alcuni studi già citati^{9,171}, ed hanno pertanto contribuito a generare confusione sulla reale frequenza del fenomeno.

In questo scenario, caratterizzato da dati di prevalenza contrastanti e criteri di selezione e diagnosi dei pazienti non del tutto definiti, si è inserito il nostro progetto di screening sistematico per la MF in una coorte giovani adulti con ictus ischemico o TIA.

L'obiettivo primario del lavoro è stato indagare prospetticamente la frequenza della MF in una coorte italiana di giovani adulti con ischemia cerebrale (ictus o TIA) ammessi presso la Stroke Unit e Neurologia ed i Reparti di Neurologia I e II dell'azienda Ospedaliero Universitaria Careggi (AOUC) di Firenze. L'accuratezza della diagnosi di MF è stata garantita, dopo l'esecuzione dei test di screening (dosaggio della α -GAL A nei maschi e analisi molecolare del gene GLA nelle femmine) da un'attenta valutazione multidisciplinare da parte degli specialisti con expertise nella MF afferenti al Centro di riferimento per la MF della AOUC. Questo scrupoloso percorso di valutazione dei pazienti è stato necessario particolarmente per l'identificazione della patogenicità delle eventuali nuove mutazioni identificate.

Un obiettivo secondario del lavoro è stata invece la valutazione di eventuali parametri clinico-strumentali che potessero aiutare il medico ad identificare i pazienti con ictus da sottoporre a screening per la MF.

Metodi:

Criteri di inclusione: sono stati arruolati pazienti di entrambi i sessi, di età compresa tra 18 e 60 anni, ricoverati per ischemia cerebrale acuta (ictus ischemico: IS o TIA) sia che si trattasse di un primo evento che di un episodio ricorrente. Le due patologie indice, IS e TIA, sono stati diagnosticati da neurologi esperti in patologia cerebrovascolare, sulla base di dati clinici e neuroradiologici (TAC cerebrale o RM). Il TIA è stato definito come un evento

cerebrovascolare della durata inferiore alle 24 ore.

Criteri di esclusione: erano criterio di esclusione una diagnosi nota di MF o l'impossibilità del paziente a fornire il consenso informato allo studio.

Il Comitato etico locale ha approvato il disegno dello studio il 27 marzo 2010.

Valutazione clinico/strumentale dei pazienti: dopo il conseguimento del consenso informato, i pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione standardizzata, comprensiva di una dettagliata anamnesi personale e familiare ed un esame obiettivo generale e neurologico completo al momento dell'arruolamento. Abbiamo in particolare ricercato sistematicamente i caratteri suggestivi per MF (angiocheratoma, episodi ricorrenti di dolore delle estremità, proteinuria all'analisi su spot delle urine, insufficienza renale cronica e ipertrofia cardiaca). Abbiamo determinato la gravità dell'ischemia cerebrale mediante la somministrazione della scala NIHSS¹⁷² al basale e al momento della dimissione.

Le indagini di diagnostica cerebrale, vascolare e cardiaca, gli esami del sangue e delle urine sono stati eseguiti secondo le linee guida italiane per l'ictus¹⁷³. L'eziopatogenesi dell'episodio è stata classificata sulla base dei criteri TOAST (Trial of Or 10172 in Acute Stroke Treatment)¹⁷⁴. Le indagini di laboratorio specifiche sono state eseguite in collaborazione con il laboratorio di malattie Metaboliche dell'ospedale pediatrico Meyer per quanto riguarda il dosaggio dell'attività di α -GAL A, e il laboratorio di Diagnostica Genetica dell'AOUC per quanto riguarda l'analisi molecolare del gene GLA.

Esami di laboratorio specifici: il dosaggio dell'attività di α -GAL A e degli enzimi lisosomiali di controllo è stato misurato su lisati cellulari di leucociti utilizzando il metodo fluoro genico con 4metilumbelliferil- α -dgalactopyranoside (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)¹⁷⁵. Il range di riferimento dell'attività leucocitaria di α -GAL A del nostro laboratorio è 20-65 nmol/mg di proteina/h.

Analisi del DNA genomico: il DNA necessario all'analisi molecolare è stato estratto dai leucociti. Sono stati amplificati mediante la *polymerase chain reaction* (PCR) i 7 esoni e le

regioni introniche immediatamente adiacenti. La pCR è stata eseguita utilizzando per tutti gli esoni 1 U Amplitaq Gold (Applied Biosystems). I prodotti della PCR sono stati sequenziati mediante 377 DNA Sequencer, mentre l'analisi delle mutazioni è stata eseguita mediante Sequence Navigator software (Applied Biosystems).

Isolamento ed analisi dell'RNA: l'RNA totale è stato isolato da linfociti coltivati Pt3 derivate utilizzando il kit RNeasy mini (Qiagen, Hilden, Germania). L'integrità dell'RNA e la sua concentrazione sono stati entrambi controllati con uno spettrofotometro utilizzando gel agarosio all'1% e Nanodrop® ND -1000 (tecnologie Nanodrop, Wilmington, USA). L'RNA è stato retrotrascritto utilizzando sia uno specifico innesto 3' UTR primer (GLA_RNA_7R 5'-TCTTTTAATGACATCTGCAT-3') che esameri random usando Superscript II first Strand kit (Invitrogen, Carlsbad CA USA) secondo le istruzioni del produttore. La successiva analisi PCR è stata eseguita utilizzando 2µl di prodotto retrotrascrizione come *template* ed i *primers* GLA_RNA_3F, 5' - TTCACAGCAAAGGACTGAAG - 3' e GLA_RNA_5R, 5' - TGGTCCAGCAACATCAACAA - 3'. Prodotti di RT - PCR sono stati controllati da gel di agarosio utilizzando 2 % agarosio basso-fondenti (Eurobio, Francia) + 1 % agarosio standard (AB Analitica, Italia). I prodotti RT-PCR erano controllati utilizzando gel di agarosio: 2% Agarose Low Melting (Eurobio, France) + agarosio standard 1% (AB Analitica, Italy). I prodotti di PCR sono stati purificati in gel di agarosio e sequenziati.

Procedure di screening e di conferma diagnostica della MF: I test enzimatici e genetici sono stati eseguiti da uno staff in cieco rispetto ai dati clinici.

I pazienti di sesso maschile sono stati scrinati attraverso dosaggio dell'attività dell'enzima α -GAL A nei leucociti; l'analisi molecolare del gene GLA è stata condotta negli uomini con α -GAL A <20 nmol/mg di proteina/h (valori normali: 20-65 nmol/mg di proteina/hr) e in tutte le donne arruolate; non abbiamo eseguito il test enzimatico come procedura di screening nelle donne in considerazione dell'alto tasso di risultati falsi negativi (a causa del fenomeno della

lyonizzazione, ovvero dell'inattivazione casuale di una delle copie del cromosoma X nei diversi tipi cellulari, l'espressione dell'attività di α -GAL A è variabile nei differenti tessuti)⁷⁵⁻⁷⁶.

Abbiamo diagnosticato la MF in presenza di: i) una mutazione già nota del gene GLA; ii) una mutazione non precedentemente descritta del gene GLA associata ad una assente o fortemente diminuita attività leucocitaria di α -GAL A (< 2 nmol/mg di proteina/hr); iii) una mutazione del gene GLA non precedentemente descritta associata a un valore > 2 nmol/mg di proteina/h di α -GAL A e almeno 1 dei seguenti 3 criteri supplementari: a) segni specifici e non altrimenti spiegabile di MF (cornea verticillata, angiocheratoma, acroparestesie dolorose conseguenti ad una neuropatia delle piccole fibre nervose diagnosticata a mezzo della biopsia cutanea¹⁷⁶, b) evidenza istologica di accumulo glicosfingolipidi in un organo sintomatico, c) test di laboratorio aggiuntivi, ad es. analisi dell'espressione dell'RNA messaggero. Il iii) il criterio è stato formulato ai fini di diagnosticare la MF nelle donne eterozigoti, o negli uomini con attività enzimatica residua (varianti ad esordio tardivo). Abbiamo considerato quale polimorfismo la variazione di sequenza c.937G > T (p.Asp313Tyr)⁴⁷ e gli aplotipi del gene GLA precedentemente riportati come neutri¹⁷⁵.

Analisi statistica: l'analisi statistica è stata effettuata con il software SPSS versione 20.0.

La prevalenza della MF è stata stimata utilizzando gli IC 95% (secondo la distribuzione di Poisson)¹⁷⁷. I dati demografici e clinici sono stati riassunti in statistiche descrittive. È stato condotto un confronto di dati demografici, fattori di rischio, ricorrenza di TIA/ictus, caratteristiche cliniche e radiologiche (gravità dell'ischemia, patogenesi TOAST, infarto territoriale vs lacunare), storia familiare e caratteristiche suggestive di MF (angiocheratoma, episodi ricorrenti di dolore delle estremità, proteinuria, insufficienza renale cronica, ipertrofia cardiaca) in accordo alla diagnosi di MF. Abbiamo utilizzato il test di Mann-Whitney per le variabili continue ed il test esatto di Fisher per le variabili discrete. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati:

Da Gennaio 2011 a Dicembre 2012, abbiamo screenati per MF 108 pazienti con ictus ischemico o TIA (maschi: 61,1%; età mediana: 48 anni, IQT 42-54; NIHSS mediana all'esordio: 4, IQT 2-9). L'evento qualificante era il TIA in 17 (15,7 %) e l'ictus ischemico in 91 (84,3 %) pazienti (Tabella 1).

Quattro pazienti sono stati esclusi per una precedente diagnosi di MF e 17 ulteriori pazienti a causa della mancanza del consenso informato (afasia grave: 4, coma e morte durante l'ospedalizzazione: 2; rifiuto di partecipare allo studio: 8; impossibilità all'arruolamento: 3).

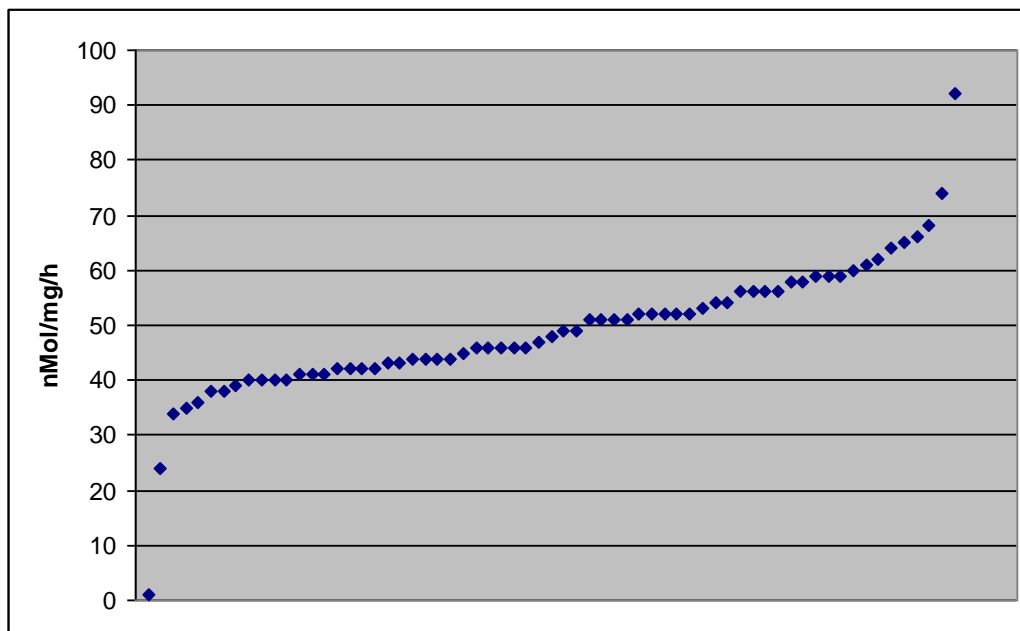
I pazienti esclusi (senza MF) erano più anziani (età mediana: 55 anni, range IQT: 50-58; $p < 0.01$) e presentavano più frequentemente un'anamnesi positiva per fibrillazione atriale ($p = 0,02$). Non sono state identificate ulteriori differenze significative in merito a recidiva di ictus, patogenesi TOAST, storia familiare e fattori di rischio.

Tabella 1. Demografici, evento indice, ricorrenza in accordo alla diagnosi di malattia di Fabry

	Totale N. 108 (%)	Fabry N. 3 (%)	No Fabry N. 105 (%)	P
Maschi	66 (61.1)	1 (33.3)	65 (61.9)	n.s
Età mediana, anni	48 (42-54)	42.1	48.2 (42-53)	n.s
Evento indice				
Ictus ischemico	91 (84.3)	3 (100.0)	88 (83.8)	n.s
TIA	17 (15.7)	0 (0.0)	17 (16.2)	n.s
NIHSS basale, mediana	4 (2-9)	3	4 (2-9)	n.s
NIHSS alla dimissione, mediana	1 (0-4)	3	0 (0-4)	n.s

Negli uomini, il valore mediano dell'attività di α -GAL A nei leucociti era 48 nmol/mg di proteina/hr (range IQT 42-56) (Figura 1). Un'attività enzimatica al di sotto del range di normalità (1.0 nmol/mg di proteina/h) è stata rilevata solo in un uomo di 59 anni, con ictus lacunare ricorrente, ed il sequenziamento del suo DNA ha identificato una mutazione del gene GLA già nota, c.901C > G (p.Arg301Gly)¹⁷⁸ (Pt 1).

Figura 1. Attività dell' α -galattosidasi A leucocitaria nei 66 pazienti di sesso maschile. Ogni punto rappresenta un paziente.



Nelle femmine, l'analisi genetica ha identificato 2 nuove mutazioni del gene GLA in condizioni di eterozigosi: la sostituzione di singolo nucleotide c.1244T > G (Pt 2) e la piccola delezione di 9 nucleotidi c.548 - 3_553del9 (Pt3).

La mutazione c.1244T > G è responsabile della sostituzione aminoacidica della leucina in posizione 415 con arginina (p.Leu415Arg), mentre la delezione c.548 - 3_553del9 altera il sito accettore di splicing dell'esone 4.

Per comprendere meglio l'effetto della mutazione c.548 - 3_553del9 sulla sintesi e processazione dell'RNA abbiamo condotto ulteriori studi individuando uno skipping completo nella trascrizione dell'esone 4, che conduce al *frameshift* p.Gly183Afs17.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei 3 pazienti affetti da malattia di Fabry

	# 1	# 2	# 3
Sesso	M	F	F
Età alla diagnosi, anni	59	42	32
Evento indice	Ictus	Ictus	Ictus
NIHSS basale	6	1	5
NIHSS alla dimissione	6	0	3
modified Rankin Scale dimissione	4	0	2
TIA/ictus recorrente, (esordio, anni)	sì (54)	sì (30)	sì (28)
N. TIA/ictus precedenti	2	3	1
TOAST (prima della diagnosi di MF)	Malattia del piccolo vaso	Indeterminato	Altra causa
Caratteri specifici di MF			
Angiocheratoma	Sì	--	--
Acroparestesie dolorose	--	Sì	Sì
Proteinuria (spot del mattino)	--	--	--
Insufficienza renale cronica	--	--	--
Ipertrofia cardiaca	Sì	--	--
Cornea verticillata	--	Sì	Sì
Fattori di rischio	Ipertensione, obesità, fumo	Obesità	--
Storia familiare			
Malattia cerebrovascolare	Sì	--	Sì
Malattia cardiovascolare	Sì	Sì	Sì
Chronic renal failure	--	Sì	--
Mutazione gene GLA	c.901C>G (R301G)	c.1244T>G (L415R)	c.548-3_553 del (G183Afs17)
Attività α -GAL A leucocitaria (v.n. 20-65 nMol/mg/h)	1.0	15.9	13.4

Pt2 era una donna di 42 anni con ictus e TIA di tipo indeterminato ricorrenti, mentre Pt3 era una donna di 32 anni con ictus ricorrenti da altra eziologia determinata (malattia di Behcet). Entrambe le pazienti presentavano una ridotta attività leucocitaria di α -GAL A (15,9 e 13,4 nmol/mg di proteina/h, rispettivamente), cornea verticillata ed acroparestesie dolorose (sensibile riduzione della densità delle piccole fibre nervose, sia di tipo somatico che autonomico alla biopsia cutanea).

Il ritardo diagnostico tra il primo ictus e la diagnosi di MF era di 5 anni in Pt1, 12 anni in Pt2, e 4 anni in Pt3. Le caratteristiche cliniche dei 3 pazienti con MF sono dettagliate in tabella 2. All'analisi univariata (tabelle 3 e 4) le caratteristiche significativamente associate alla MF sono risultate: angiocheratoma ($p < 0.028$), episodi ricorrenti di dolore delle estremità ($p < 0.001$), storia familiare di malattia cardiovascolare ($p = 0.045$), ricorrenza di TIA/ictus ($p = 0.004$), infarto lacunare alla TC o RM encefalo ($p=0.024$).

Tabella 3. Analisi univariata in accordo alla diagnosi di malattia di Fabry dei caratteri sistemici suggestivi per malattia di Fabry e della storia familiare

	Totale N. 108 (%)	Fabry N. 3 (%)	No Fabry N. 105 (%)	P
Caratteri suggestivi per MF				
Angiocheratoma	1 (0.9)	1 (33.3)	0 (0)	0.028
Episodi di dolore mano/piede	7 (6.5)	2 (66.7)	5 (4.8)	< 0.001
Proteinuria (spot del mattino)	4 (3.7)	0 (0.0)	4 (3.7)	n.s
Insufficienza renale cronica	3 (2.8)	0 (0.0)	3 (2.8)	n.s
Ipertrofia cardiaca	20 (18.5)	1 (33.3)	19 (18.3)	n.s
Storia familiare				
Malattia cerebrovascolare	38 (35.2)	2 (66.7)	36 (34.3)	n.s
Malattia cardiovascolare	39 (36.1)	3 (100.0)	36 (34.3)	0.045
Insufficienza renale cronica	6 (5.6)	1 (33.3)	5 (4.8)	n.s

Tabella 4. Analisi univariata in accordo alla diagnosi di malattia di Fabry delle caratteristiche radiologiche ed eziopatogenetiche (TOAST, fattori di rischio vascolare) dell'ischemia cerebrale

	Totale N. 108 (%)	Fabry N. 3 (%)	No Fabry N. 105 (%)	P
TIA/ictus ricorrente	29 (26.8)	3 (100.0)	26 (24.8)	0.004
Infarto lacunare (TC o RMN)	27 (29.7)	3 (100.0)	24 (27.3)	0.024
TOAST				
Aterotrombosi	10 (9.2)	0 (0.0)	10 (10.5)	n.s
Cardioembolia	26 (24.1)	0 (0.0)	26 (25.0)	n.s
Malattia del piccolo vaso	16 (14.8)	1 (33.3)	16 (14.3)	n.s
Altra causa nota	22 (20,4)	1 (33.3)	21 (20,0)	n.s
Causa indeterminate	34 (31.5)	1 (33.3)	33 (31.4)	n.s
Fattori di rischio				
Ipertensione	52 (48.1)	1 (33.3)	51 (48.6)	n.s
Dislipidemia	45 (41.7)	0 (0.0)	45 (43.3)	n.s
Fumo in atto	41 (38.0)	1 (33.3)	40 (38.1)	n.s
Sovrappeso corporeo	30 (27.8)	2 (66.7)	28 (26.9)	n.s
Iperomocisteinemia (N. 96)	16 (16.7)	1 (33.3)	15 (15.6)	n.s
Diabete	11 (10.2)	0 (0.0)	11 (10.6)	n.s
Trombofilia ereditaria (N. 88)	12 (11.1)	0 (0.0)	12 (11.4)	n.s
Alcool	3 (2.8)	0 (0.0)	3 (2.9)	n.s
Fibrillazione atriale	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0)	n.s
Contraccettivi orali (F, N. 42)	6 (14.3)	0 (0.0)	6 (14.3)	n.s

È stato interessante notare che, nella nostra esperienza, l'insufficienza renale cronica e la proteinuria documentata all'analisi su spot delle urine non erano presenti nei pazienti con MF ed ictus ischemico cerebrale.

Abbiamo inoltre individuato il polimorfismo c.937G > T (p.Asp313Tyr) in una donna di 48 anni con ictus ischemico (primo episodio) di natura indeterminata e insufficienza renale cronica. La sua attività leucocitaria di α -GAL A era 27,0 nmol/mg di proteina/h e la paziente

non presentava segni specifici di MF quali angiocheratoma, cornea verticillata, acroparestesie dolorose. La paziente era stata precedentemente indagata per l'insufficienza renale attraverso una biopsia renale, che non era risultata specifica per MF.

Discussione:

Su 108 giovani adulti con ictus ischemico/TIA abbiamo diagnosticato 3 pazienti (2,8%, IC 95%: 0,57-8,18) con MF precedentemente non identificati.

Il nostro risultato discorda dagli altri screening condotti in ambito cerebrovascolare. E' inferiore rispetto alla frequenza del 3,9% (nei due sessi) identificata nel lavoro di Rolfs et al.¹⁶⁸, anche se da una parte il nostro lavoro diverge in merito a differenze nei criteri di inclusione (non essendo stato il nostro progetto limitato solo ai criptogenici), dall'altra non sono mai state pubblicate le mutazioni identificate nel lavoro tedesco, in cui non è quindi possibile escludere l'inclusione di polimorfismi rari come la c.937G > T (p.Asp313Tyr) nel computo della prevalenza. Anche nella stima delle prevalenze documentate negli studi di Baptista et al. (2,4%)⁹ e Brouns et al. (1,0%)¹⁷¹ erano inclusi pazienti con c.937G > T (p.Asp313Tyr), che erano stati invece esclusi nel lavoro di Wozniak et al. (0,2%)¹⁷⁰, in maniera analoga a noi.

Nei due anni di arruolamento dei pazienti presso il nostro ospedale, sono stati pubblicati a livello internazionale altri 4 studi di screening per la MF in ambito cerebrovascolare.

Marquandt et al.¹⁷⁹ hanno condotto uno studio di popolazione su pazienti inglesi con TIA o ictus ischemico di qualsiasi età, inclusi 154 pazienti al di sotto dei 60 anni. In questo lavoro nessun paziente è risultato portatore di una mutazione patogena per MF, mentre 5 casi,

peraltro ultrasessantenni, erano portatori della c.937G > T (p.Asp313Tyr). Dubuc et al.¹⁸⁰

hanno individuato 1 caso su una coorte ospedaliera di 100 pazienti canadesi, mentre Sarikaya et al.¹⁸¹ non hanno individuato nessun caso su 150 pazienti svizzeri screenati. Il quinto lavoro,

un grande studio multicentrico condotto sempre da Rolfs et al⁷. Su 5023 pazienti con ictus giovanile, il SIFAP, ha identificato 27 (0,5%) casi di MF “definita”, ovvero conseguente a mutazioni che gli autori hanno considerato come sicuramente patogene, e ulteriori 18 casi (0,4%) di MF “possibile”, ad es. perché portatori della c.937G > T (p.Asp313Tyr).

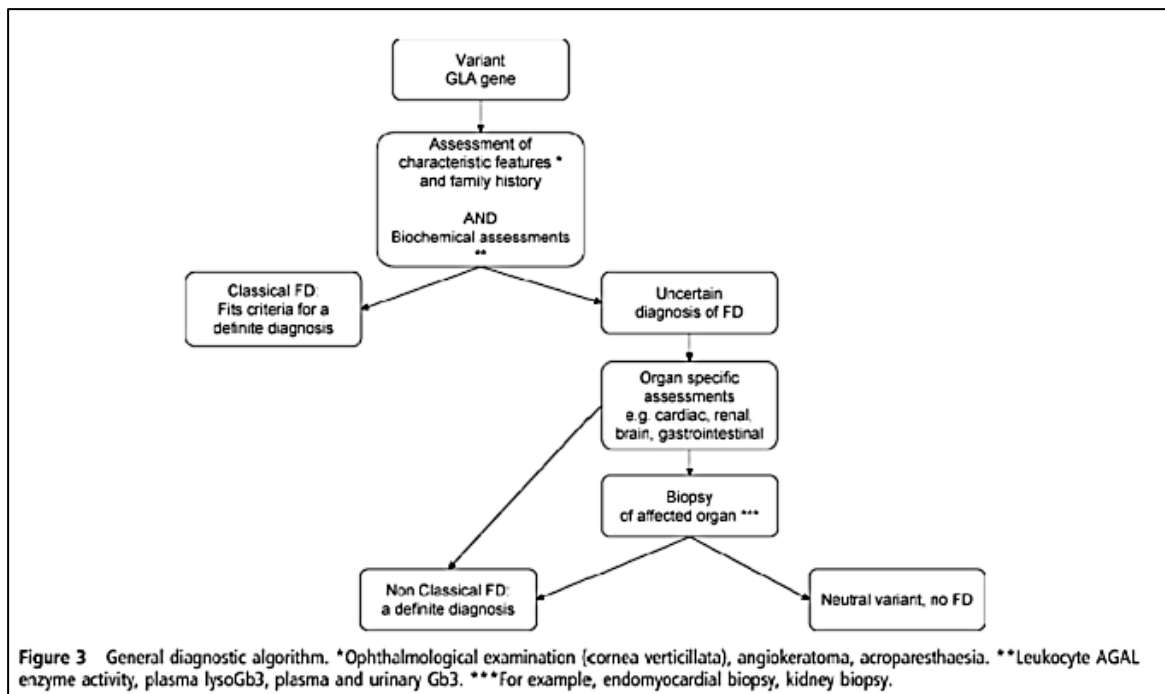
Alla luce di questi studi il nostro dato di prevalenza della MF del 2,8%, essendo anche stata esclusa la paziente con c.937G > T (p.Asp313Tyr), è senza dubbio inatteso; d’altro canto il percorso di valutazione dei pazienti che ha portato alla formulazione della diagnosi di MF è stato molto accurato e ci permette di essere confidenti della veridicità della diagnosi. Nella nostra coorte abbiamo identificato un’unica mutazione già nota, la mutazione missense c.901C > G (p.Arg301Gly), precedentemente associata al fenotipo classico di MF¹⁷⁸ in Pt1.

In entrambe le femmine abbiamo riscontrato mutazioni precedentemente non descritte. In Pt2 abbiamo identificato la mutazione puntiforme c.1244T > G, che comporta una sostituzione di un residuo aminoacidico molto conservato nell’evoluzione (p.Leu415Arg). Sono state riportate in letteratura due mutazioni missense nello stesso codone: la c.1244T > C (Leu415Pro) è stata associata ad assente attività della α -GAL A leucocitaria e fenotipo classico di MF in un paziente maschio¹⁸², mentre la c.1244T > A (Leu415Phe) è stata rilevata in una femmina ed è meno caratterizzata^{7,183}. Nella nostra paziente la c.1244T > G (Leu415Arg) provoca la sostituzione tra un aminoacido altamente conservato ed un aminoacido con proprietà chimico-fisiche differenti, suggerendo la possibilità di una rilevante alterazione della struttura dell'enzima. In Pt3 abbiamo rilevato una piccola delezione del boundary introne-esone dell’esone 4, c.548 - 3_553 del9, che altera il sito accettore di splicing dell'esone, e quindi determina il frameshift p.Gly183Alafs17 *. Queste informazioni genético-molecolari inerenti le nuove mutazioni identificate ci permettevano già di sostenerne la patogenicità, che abbiamo comunque supportato con valutazioni cliniche.

Van der Tol et al.¹⁸⁴ dopo aver recentemente rivisto gli screening per MF condotti in popolazioni ad alto rischio (insufficienza renale cronica, cardiopatia ipertrofica, ictus

giovanile) e neonati, aveva concluso che la maggior parte delle mutazioni del gene GLA identificate nei programmi di screening sistematico ha una patogenicità sconosciuta. Ha pertanto sottolineato la necessità di cercare dei criteri diagnostici aggiuntivi, di natura clinica o biochimica (diminuita attività della α -GAL A nei leucociti, incremento di lysoGb3 plasma e di Gb3 in plasma ed urine), proponendo un algoritmo da utilizzare per confermare la patogenicità di queste mutazioni. (figura 2).

Figura 2. Algoritmo per la diagnosi della malattia di Fabry proposto da van Der Tol et al¹⁸⁴



I nostri criteri per la diagnosi di MF sono sostanzialmente in accordo con quest'algoritmo (anche se non siamo stati in grado di misurare presso i nostri laboratori lysoGb3 e Gb3). A confermare la patogenicità delle nuove mutazioni identificate in Pt2 e Pt3, l'attività della α -GAL A nei leucociti è ridotta in entrambe le pazienti e caratteristiche specifiche e non altrimenti spiegabili della MF, come la cornea verticillata e la neuropatia delle piccole fibre nervose sintomatica per acroparestesie dolorose febbrili, sono presenti in entrambe. Anche nel

paziente di sesso maschile, Pt1, è presente un segno specifico di MF, l'angiocheratoma corporis.

È interessante notare che tutti i pazienti con MF della nostra coorte hanno presentato almeno un precedente ricovero in ospedale a causa di un ictus ischemico. Da questa considerazione deduciamo che la conoscenza della MF tra i medici dedicati alla cura dell'ictus sia ancora insufficiente, e che pertanto la diagnosi di questa condizione curabile sia talvolta mancante. In Pt1, l'assenza di coinvolgimento renale e la confondente presenza dell'ipertensione arteriosa, avevano condotto alla diagnosi errata di ictus lacunare da angiopatia ipertensiva, in Pt2 e Pt 3, la presenza di episodi di dolore delle estremità aveva suggerito la possibilità di una malattia disimmune (un caso era stato erroneamente diagnosticato come malattia di Behçet). Come abbiamo visto (Tabella 2), caratteristiche tipiche della MF erano presenti in tutti i pazienti e avrebbero potuto portare alla corretta diagnosi.

L'inclusione dei pazienti con ictus cerebrale ricorrente all'interno del campione da sottoporre a screening è stato a nostro avviso il fattore che ha contribuito significativamente alla riuscita del progetto, ovvero all'identificazione di nuovi pazienti con MF. Tra gli studi di screening precedentemente discussi, 4 lavori (Rolfes et al.¹⁶⁸, Brouns et al. prospettico¹⁷¹, Dubuc et al.¹⁸⁰ ed il SIFAP⁷), per un totale di 6947 pazienti, hanno incluso sia soggetti con primo ictus che con ischemia cerebrale ricorrente. Se analizziamo cumulativamente i loro risultati, osserviamo che la frequenza della MF nei pazienti affetti da primo ictus è 63/5773 (1,1%), mentre la frequenza in caso di ricorrenza è 21/1174 (1,8%), una differenza statisticamente significativa ($p = 0,046$). Quando abbiamo cercato di analizzare i possibili predittori di MF nel nostro campione, abbiamo identificato che la ricorrenza di ischemia cerebrale era un potenziale indicatore di MF all'analisi univariata, accanto ad altre caratteristiche che sono però più strettamente specifiche della malattia, quale l'angiocheratoma corporis e la storia di dolori delle estremità.

Dalla nostra analisi emerge inoltre un'associazione statisticamente significativa tra MF ed infarto di tipo lacunare alla TC o RMN encefalo. Anche se nella MF l'ictus ischemico cerebrale si può generare attraverso molteplici meccanismi¹³⁴, l'occlusione del piccolo vaso è probabilmente il meccanismo patogenetico più frequente¹⁵¹ e pazienti con ictus giovanile che presentino questo reperto radiologico dovrebbero essere testati sistematicamente per la MF. L'analisi univariata dei possibili fattori associati a MF ha riscontrato un'associazione statisticamente significativa anche per la familiarità cardiovascolare (34% dei pazienti Fabry negativi vs 100% dei pazienti Fabry positivi, $p = 0,043$); era presente inoltre una certa differenza nei due gruppi in merito alla familiarità per insufficienza renale cronica (5% vs 33%), mentre la familiarità cerebrovascolare era discretamente rappresentata anche nei pazienti con ictus giovanile ma non affetti da MF (35% vs 67% nei pazienti Fabry). Anche se questi dati devono essere interpretati con cautela, data la bassa numerosità del campione, è possibile che sia proprio la presenza di una storia familiare positiva per patologia cardiaca o renale il parametro più utile ad identificare i pazienti a maggior rischio di MF. Infatti la familiarità cerebrovascolare è caratteristica non solo della MF, ma anche di altre patologie monogeniche associate ad ictus (come discusso nella sezione introduttiva) o di condizioni anche poligeniche che possono conferire un'eredità cerebrovascolare e potrebbe quindi essere un fattore di selezione dei pazienti meno specifico.

Un'ultima considerazione generata dai risultati di questa analisi univariata risiede nel fatto che non è stato possibile identificare un'associazione tra patologia renale e MF in questa coorte di pazienti con ictus giovanile. Nella nostra esperienza, infatti, nessuno dei pazienti con MF presentava un significativo coinvolgimento renale agli esami routinari condotti in ospedale (misurazione della creatinina o dell'eGFR per la diagnosi di insufficienza renale, esame standard delle urine per il riscontro della proteinuria). Questa osservazione è in accordo con lo studio di Sims et al. che hanno documentato che nei pazienti con MF l'ictus si verifica frequentemente prima della diagnosi e in assenza di altri eventi clinici importanti¹⁵¹. Pertanto i

medici impegnati nella pratica clinica devono essere attenti a non considerare l'opportunità di eseguire la diagnostica per MF solo in presenza di una patologia renale concomitante.

Purtroppo la numerosità del campione non ha permesso l'esecuzione di un'analisi multivariata, tuttavia riteniamo di poter suggerire di considerare attentamente l'ipotesi di MF soprattutto nei sottogruppo di pazienti con ictus giovanile ricorrente o lacunare o associato a episodi ricorrenti di dolore delle estremità o ad angiocheratoma.

In tabella 5 abbiamo riportato i criteri di selezione per lo screening per la MF nel contesto dell'ictus ischemico giovanile maturati dalla nostra esperienza. Sarebbe interessante validare questo algoritmo di screening nel contesto di uno studio multicentrico con adeguata numerosità di campione.

Tabella 5. Criteri di screening per la malattia di Fabry nel contesto dell'ictus ischemico giovanile derivati dalla nostra esperienza

Entrambi i seguenti: Diagnosi di ictus ischemico / TIA Età < 60 anni
Almeno 3 dei seguenti: Ricorrenza di ischemia cerebrale Infarto lacunare al neuroimaging Episodi ricorrenti di dolore delle estremità Angiocheratoma corporis Familiarità cardiovascolare

Un limite del nostro studio risiede nella numerosità del campione esaminato, piuttosto bassa (108 pazienti), laddove la maggior parte degli studi pubblicati ha arruolato oltre 500 pazienti con ictus. Questo limite deriva dalla natura monocentrica del progetto, che è stato limitato alla Stroke Unit e Neurologia e ai reparti di Neurologia 1 e 2 dell'Azienda Ospedaliero-Universitario Careggi di Firenze. Tuttavia, questa condizione ha assicurato: i) l'omogeneità del campione arruolato, in cui la diagnosi di ictus ischemico o TIA veniva posta da medici con lunga esperienza nella malattia cerebrovascolare, ii) un'alta qualità e completezza dei dati, che sono stati raccolti prospetticamente da un singolo operatore (IR) precedentemente addestrato nella diagnosi e nella gestione della MF presso il Centro di Riferimento per la Malattia di Fabry dell'Azienda Ospedaliero-Universitario Careggi di Firenze. L'attività di questo Centro, che segue un cospicuo numero di pazienti affetti da MF e provenienti da varie regioni italiane, è stata indirettamente documentata dal fatto che nell'arco di 2 anni si sono ricoverati presso i 3 reparti che partecipavano allo studio ben 4 pazienti con recidiva di ictus ischemico in corso di MF, che erano seguiti presso il Centro e pertanto sono stati trasferiti al nostro ospedale per le dovute cure.

Conclusioni :

La MF è una possibile causa di ischemia cerebrale (TIA o ictus) in una piccola percentuale di pazienti giovani adulti di entrambi i sessi; la nostra esperienza suggerisce che possa essere responsabile fino al 2,8% (IC 95%: 0,57-8,18) degli ictus/TIA in epoca giovanile.

La diagnosi di MF richiede una collaborazione multidisciplinare tra medici con esperienza nella diagnosi e nel *management* di questo disordine, biochimici e genetisti; la conferma della patogenicità delle mutazioni individuate all'interno di programmi di screening sistematico non può infatti basarsi solo su considerazioni genetiche, considerando l'alta frequenza di mutazioni del gene GLA di nuova identificazione e le difficoltà di valutazione della loro

rilevanza clinica, ma può essere posta solo al termine di un percorso di individuazione dei vari segni caratteristici della malattia e di attribuzione sicura della loro presenza alla MF.

La rarità e l'eterogeneità clinica della MF fanno sì che i medici siano poco familiari con questa trattabile malattia metabolica, causando lunghi ritardi diagnostici. Una valutazione sistematica dei pazienti con ictus giovanile finalizzata all'identificazione di segni specifici di MF (angiocheratoma, cornea verticillata, acroparestesie dolorose) può facilitare il corretto inquadramento diagnostico.

Nella nostra esperienza è stata inoltre riscontrata una significativa associazione tra ricorrenza di ischemia cerebrale ed infarto di tipo lacunare e MF, e tra familiarità cardiovascolare e MF, pertanto suggeriamo di sottoporre tutti i pazienti con ictus giovanile che presentino queste caratteristiche concomitanti ai test di screening per la MF.

Eziologia dell'ictus ischemico giovanile in una serie continua di pazienti ricoverati presso la Stroke Unit e Neurologia ed i reparti di Neurologia 1 e 2 dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

Background ed obiettivo dello studio:

Nei paesi occidentali l'ictus ischemico giovanile rappresenta, secondo uno studio di popolazione italiano, circa il 2% degli ictus ischemici verificatisi nella comunità dell'Aquila⁴ e, secondo uno studio tedesco, circa il 6% degli ictus ammessi in ospedale¹⁸⁵.

Al momento in cui è iniziato questo progetto di ricerca inerente lo screening per la malattia di Fabry (MF) nel contesto dell'ictus giovanile, i dati inerenti fattori di rischio ed eziopatogenesi dell'ictus giovanile erano in limitati, provenendo da ricerche con disegno retrospettivo e raccolti in ampi intervalli di tempo, durante i quali erano occorsi cambiamenti nella pratica clinica ospedaliera.

Obiettivo di questo secondo studio è stato descrivere la distribuzione dei fattori di rischio e la specifica eziologia dell'ischemia cerebrale del giovane adulto, utilizzando una serie consecutiva di pazienti ammessi presso la Stroke Unit e Neurologia ed i reparti di Neurologia 1 e 2 dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi di Firenze, in accordo a due differenti fasce di età (quella che più ristrettamente corrisponde alla definizione di ictus giovanile, ovvero < 45 anni, e i pazienti con età compresa tra 45 e 60 anni).

Metodi:

Sono stati inclusi in questa analisi i pazienti affetti da ischemia cerebrale (TIA/ictus ischemico) ed età inferiore ai 60 anni, consecutivamente ricoverati presso la Stroke Unit e Neurologia ed i reparti di Neurologia 1 e 2 negli anni 2011-2012 e che avevano fornito il loro consenso informato alla partecipazione allo studio clinico “*Screening per la malattia di Fabry in una serie continua di giovani adulti con patologia cerebrovascolare ischemica acuta, ricoverati presso la Stroke Unit e Neurologia dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze*”. I criteri di inclusione ed esclusione dei pazienti, le indagini cliniche, laboratoristiche e strumentali eseguite sono stati descritti nella sezione metodi della precedente sezione. Tutti i dati oggetto dell’analisi statistica sono stati inseriti nel database elettronico in modo consecutivo e prospettico.

Riportiamo di seguito le definizioni, in parte già dettagliate nei metodi del precedente lavoro, dei principali parametri clinico-radiologici che sono stati oggetto dell’analisi statistica:

Ictus (secondo la definizione dell’OMS): improvvisa comparsa di segni e/o sintomi riferibili a deficit locale e/o globale (coma) delle funzioni cerebrali, di durata superiore alle 24 ore o con esito infausto, non attribuibile ad altra causa apparente se non a vasculopatia cerebrale.

TIA (attacco ischemico transitorio): evento cerebrovascolare ischemico della durata inferiore alle 24 ore.

NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale)¹⁷²: scala di impiego internazionale utilizzata per la stima della gravità dell’ischemia cerebrale, particolarmente dell’ictus ischemico.

Lacuna: l’infarto di tipo lacunare è stato diagnosticato dal neuroradiologo al momento della refertazione, quando al neuroimaging veniva evidenziato un infarto di forma rotondeggiante o

ovalare e diametro inferiore al cm, localizzato nel territorio delle piccole arterie perforanti superficiali o profonde.

TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) classification¹⁷⁴: individua 5 sottotipi patogenetici di ictus ischemico cerebrale: 1) la malattia aterosclerotica delle grandi arterie intra- o extra craniche; 2) la cardioembolia; 3) la malattia del piccolo vaso cerebrale; 4) altre cause identificate; 5) ictus da causa indeterminata, includente l'ictus da due o più cause possibili, l'ictus con accertamenti incompleti e l'ictus con accertamenti negativi). La categoria di ictus da cardioembolia è stata a sua volta suddivisa in 2 sottogruppi, a seconda della presenza di una fonte embolica ad alto o basso rischio. Sono state considerate fonti ad alto rischio embolico: trombosi atriale o ventricolare sinistra, fibrillazione e flutter atriale, malattia del nodo del seno, protesi valvolari meccaniche, infarto miocardico recente (< 4 settimane), cardiomiopatia dilatativa, vegetazioni valvolari infettive o marantiche, tumori intracardiaci. Sono invece state classificate come fonti a basso rischio embolico: il forame ovale pervio, l'aneurisma del setto interatriale, le malformazioni arterovenose polmonari, il prolasso della valvola mitrale.

Ischemia cerebrale ricorrente: evento ischemico cerebrovascolare preceduto da un episodio distinto di TIA o ictus ischemico (occorso quindi prima del ricovero per l'evento indice).

Abbiamo condotto un'analisi statistica di tipo descrittivo della popolazione oggetto di studio, al fine di raccogliere informazioni inerenti le caratteristiche cliniche e l'eziopatogenesi dell'ictus ischemico in questa fascia di età. In particolare abbiamo incentrato l'analisi sul confronto tra la fascia di età < 45 anni (corrispondente alla più definizione più restrittiva di ictus ischemico giovanile) e quella compresa tra 45 e 60 anni, discutendo le eventuali differenze in merito a dati demografici, fattori di rischio, gravità dell'ischemia misurata mediante la scala NIHSS al basale e alla dimissione, patogenesi TOAST, presenza di ricorrenza di TIA/ictus, storia familiare. Abbiamo utilizzato il test T di Student per le variabili

continue ed il test del Chi quadro per le variabili discrete. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati:

Da Dicembre 2011 a Gennaio 2013 sono stati ammessi presso la Stroke Unit e Neurologia ed i reparti di Neurologia 1 e 2 dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi 137 pazienti di età inferiore a 60 anni con sospetto clinico di ictus ischemico/TIA.

In 8 pazienti (5,8%), al termine degli accertamenti eseguiti durante il ricovero, non è stato confermato il sospetto diagnostico iniziale; questa piccola popolazione era dunque affetta da patologie che avevano mimato un TIA o un ictus ischemico. I sintomi neurologici che avevano condotto al ricovero ospedaliero erano stati vertigini e disequilibrio (x2), diplopia (x2), parestesie di un arto (x2), ipostenia di un arto, afasia espressiva. In tutti i pazienti, ad eccezione di uno, erano presenti fattori di rischio vascolare tradizionali (ipertensione, dislipidemia, diabete o tabagismo) che hanno in parte contribuito alla genesi del sospetto diagnostico iniziale. La diagnosi di dimissione di questi 8 soggetti è stata: emicrania con aura in 2 casi; sindrome clinicamente isolata (sospetta sclerosi multipla, con bande oligoclonali positive nel liquor) in 2 casi; stenosi del canale cervicale in 1 caso, disturbo somatoforme in 1 caso, deficit neurologico post-critico (paralisi di Todd) in 1 caso, decadimento cognitivo di natura da determinare in 1 caso.

Dei restanti 129 pazienti, 21 soggetti non sono stati arruolati nel progetto di ricerca primario in quanto affetti da una diagnosi già nota di MF (4) o impossibilitati a fornire un consenso informato alla partecipazione allo studio (17), come già dettagliato nella precedente sezione.

Sono stati pertanto analizzati i dati di 108 pazienti affetti da ischemia cerebrale acuta, di cui 91 (84,3%) ictus ischemici. Data la comune eziopatogenesi del TIA e dell'ictus ischemico, la popolazione sarà di seguito descritta come unitaria.

L'età media della popolazione risultava di 48,0 anni \pm 15,1DS. In particolare 32 soggetti risultavano possedere al momento del ricovero $<$ 45 anni, con un'età media di 36 anni \pm 5,6DS (range: 21-44 anni), mentre 76 soggetti avevano \geq 45 anni, con un'età media di 52 anni \pm 4,5DS (range: 45-60).

Abbiamo condotto un confronto tra questi due gruppi di pazienti, utilizzando quale *cut off* discriminativo l'età di 45 anni, al fine di meglio caratterizzare le caratteristiche del campione con ictus giovanile secondo l'accezione più stretta del termine.

In merito alla distribuzione dei sessi, tra i soggetti con $<$ 45 anni le donne rappresentavano il 56% del campione, mentre tra quelli più anziani erano il 32%. Questa differente proporzione era statisticamente significativa, con una $p = 0,016$.

La gravità basale dell'ischemia cerebrale risultava lievemente più alta tra i pazienti più giovani (NIHSS: $8,2 \pm 9,4$ DS vs $6,3 \pm 6,5$ DS), ma il dato non era significativo.

Due pazienti ammessi per ictus ischemico (uno per categoria) sono deceduti nel corso del ricovero, entrambi come conseguenza della grave lesione cerebrovascolare e della conseguente sindrome da ipertensione endocranica. Escludendo questi due pazienti, la gravità dell'ischemia cerebrale al momento della dimissione era di $2,4 \pm 4,9$ DS punti alla NIHSS nei pazienti giovani e $3,0 \pm 5,2$ DS tra gli anziani, anche in questo caso non statisticamente significativa.

Analizzando solamente i pazienti ammessi per ictus ischemico (N.91) i valori alla NIHSS di ammissione erano, nelle due categorie, $8,8 \pm 9,7$ DS vs $7,2 \pm 6,9$ DS, mentre i valori alla NIHSS di dimissione erano $2,6 \pm 4,6$ DS vs $3,1 \pm 5,3$ DS, entrambe le differenze non

risultavano statisticamente significative, ma era presente un trend verso un miglioramento di maggiore entità nei pazienti con < 45 anni (miglioramento alla NIHSS: $6,4 \pm 9,0$ DS vs $3,7 \pm 5,6$ DS; $p = 0,070$).

La maggior parte dei pazienti ammessi per ictus ischemico ha presentato un miglioramento clinico durante la degenza; la gravità dell'ictus è tuttavia aumentata in 5 soggetti con < 45 anni (15,6%) e in 10 soggetti ≥ 45 anni (13,1%), inclusi i 2 pazienti deceduti, e non si è verificato alcun miglioramento clinico in 2 soggetti con < 45 anni (6,2%) e in 5 soggetti ≥ 45 anni (6,6%). La proporzione di soggetti che ha presentato un miglioramento clinico è quindi risultata sovrapponibile in entrambi i gruppi (78,1% vs 80,3%), così come quella dei pazienti che hanno presentato un miglioramento ≥ 10 punti alla NIHSS (18,7% vs 14,5%).

Tabella 1. Distribuzione degli infarti in territorio vertebrobasilare in accordo alle due fasce di età analizzate (< 45 anni e ≥ 45 anni).

Sede	Soggetti < 45 anni N 12 (%)	Soggetti ≥ 45 anni N. 20 (%)
Bulbo	1 (8,3)	0 (0)
Ponte	3 (24,9)	2 (10)
Mesencefalo	1 (8,3)	1 (5)
Talamico	1 (8,3)	2 (10)
Cerebellare	4 (33,3)	7 (35)
Temporo-Occipitale	2 (16,6)	5 (25)
Infarto da occlusione del TOP della BA	0 (0)	3 (15)

In merito alla tipologia dell'infarto al neuroimaging, nei soggetti più giovani 6 pazienti avevano una lacuna (6/29 ictus: 20,7%) contro 21 pazienti con età ≥ 45 anni (21/62 ictus : 33,9%). Inoltre una discreta proporzione degli infarti sono occorsi in territorio circolatorio vertebrobasilare in entrambe le categorie di pazienti (41,4% vs 32,8%), con una lieve

prevalenza di questa sede nei soggetti con < 45 anni, ma non significativa. Nella tabella 1 sono elencate le localizzazioni degli infarti vertebrobasilari occorsi in territorio circolatorio posteriore.

La maggior parte dei pazienti affetti da ischemia cerebrale presentava almeno un fattore di rischio vascolare. Tra i pazienti giovani l'assenza di alcun fattore di rischio era presente in 7 (21,9%) casi (ed in 3 ulteriori pazienti l'unico fattore di rischio presente era una trombofilia ereditaria), mentre tra i più anziani questa condizione era presente solamente in 3 (3,9%) casi (ed in ulteriori 2 pazienti era presente solo la trombofilia ereditaria) ($p = 0,003$). La distribuzione dei fattori di rischio vascolare nelle due fasce di età è rappresentata in dettaglio nella tabella 2.

La prevalenza dei fattori di rischio vascolare tradizionali (ipertensione, dislipidemia, diabete mellito, sovrappeso corporeo, iperuricemia e fumo) è risultata maggiore nei pazienti più anziani. In particolare è stata identificata una differenza statisticamente significativa per ipertensione (15,6% vs 61,8%; $p < 0,001$), dislipidemia (21,9% vs 50,0%; $p = 0,007$) ed iperuricemia (0,0% vs 11,8%; $p = 0,042$).

Un trend opposto di prevalenza è stato invece documentato per i fattori di rischio meno convenzionali, in quanto sono risultati più rappresentati nella popolazione con < 45 anni le trombofilie ereditarie, l'abuso alcolico, gli estroprogestinici e l'iperomocisteinemia; una differenza statisticamente significativa è stata documentata per l'abuso alcolico (9,4% vs 0,0%; $p = 0,007$) e per le trombofilie ereditarie (25,0% vs 9,1%; $p = 0,049$). Le trombofilie ereditarie sono state ricercate a giudizio del medico di reparto in 90/108 pazienti; le alterazioni ricercate in modo sistematico sono state: polimorfismo per il gene della protrombina, polimorfismo V Leiden, deficit di proteina C o di proteina S, lipoproteina (a).

Non sono emerse differenze significative tra le due categorie di età né in merito alla familiarità cerebrovascolare (25,0% vs 38,1%), né in merito a quella cardiovascolare (36,3% vs 35,5%).

Tabella 2. Distribuzione dei fattori di rischio vascolare in accordo alle due fasce di età analizzate (*cut off* 45 anni).

	Soggetti < 45 anni N 32 (%)	Soggetti ≥ 45 anni N. 76 (%)	p
Ipertensione	5 (15,6)	47 (61,8)	<0,001
Dislipidemia	7 (21,9)	38 (50,0)	0,007
Diabete mellito	2 (6,2)	9 (11,8)	0,380
Iperuricemia	0 (0)	9 (11,8)	0,042
Sovrappeso corporeo	5 (16,1)	25 (32,9)	0,080
Storia di fibrillazione atriale	0 (0)	0 (0)	---
Iperomocisteinemia (N. 99)	6 (20,7)	10 (14,3)	0,431
Fumo	11 (34,4)	38 (50,0)	0,163
Trombofilia ereditaria (N. 90)	6 (25,0)	6 (9,1)	0,049
Abuso alcolico	3 (9,4)	0 (0)	0,007
Contraccettivi orali (f, N. 42)	4 (22)	2 (8)	0,203

I meccanismi patogenetici dell'ischemia cerebrale, caratterizzati secondo la classificazione TOAST, sono riportati in tabella 3.

La patologia delle grandi arterie intra- ed extracraniche era rappresentata con proporzioni analoghe nei due gruppi (9,4% vs 9,2%). Tra i pazienti più giovani hanno ricevuto questa diagnosi 3 pazienti, di cui una femmina, tutti e 3 affetti da aterosclerosi carotidea.

Tutti e 3 i pazienti risultavano essere forti fumatori, in particolare in un uomo il fumo è stato l'unico fattore di rischio identificato in un quadro di grave aterosclerosi pluridistrettuale

(omocisteina, trombofilie ereditarie e profilo anticorpale nei limiti); negli altri due casi era presente un'ulteriore associazione con dislipidemia ed iperomocisteinemia, e nel maschio, con

Tabella 3. Distribuzione dell'eziopatogenesi TOAST in accordo alle due differenti fasce di età (*cut off* 45 anni).

	Soggetti < 45 anni N 32 (%)	Soggetti ≥ 45 anni N. 76 (%)	P
Aterosclerosi delle grandi arterie	3 (9,4)	7 (9,2)	0,978
Cardioembolia	9 (28,1)	18 (23,7)	0,626
Malattia del piccolo vaso	2 (6,2)	15 (16,4)	0,079
Altre diagnosi determinate	11 (34,4)	10 (13,2)	0,011
Causa indeterminata	7 (21,9)	26 (34,2)	0,204

abuso alcolico. I 7 pazienti ≥ 45 anni avevano tutti sesso maschile, con l'eccezione di una paziente. Anche in questo caso la causa dell'ischemia cerebrale era rappresentata dall'aterosclerosi carotidea in tutti i casi eccetto un maschio portatore di stenosi di arteria intracranica (cerebrale media). In tutti i pazienti era presente un'associazione di almeno due fattori di rischio vascolare tra ipertensione, diabete mellito, dislipidemia, fumo.

In nessuno tra i 10 pazienti con malattia dei grandi vasi è stata documentata la presenza di una delle trombofilie ereditarie.

La seconda categoria TOAST, ovvero la cardioembolia, era anch'essa ugualmente rappresentata nelle due fasce di età (28,1% vs 23,7%). I dettagli dell'eziologia cardioembolica di queste coorti di pazienti sono riportati in tabella 4.

Le cause di cardioembolia sono state suddivise nei 2 sottogruppi TOAST analogamente a quanto riportato da Yesilot Barlas et al¹⁶: fonti ad alto (ad es. fibrillazione atriale) e basso rischio embolico (ad es. FOP). In entrambe le categorie di età era presente una prevalenza

Tabella 4. Descrizione delle cause di embolia cardiaca nelle due fasce di età (*cut off* 45 anni), con suddivisione tra fonti ad alto o basso rischio embolico.

	Soggetti < 45 anni N. 9 (%)	Soggetti ≥ 45 anni N. 18 (%)
Alto rischio cardioembolico		
Fibrillazione atriale	0 (0,0)	4 (22,2)
Cardiopatía aritmogena ventricolo destro	1 (11,1)	0 (0,0)
Valvulopatía esito di tetralogia Fallot	1 (11,1)	0 (0,0)
Aneurisma setto interventricolare	0 (0,0)	1 (5,6)
Basso rischio cardioembolico		
FOP + aneurisma setto interatriale	3 (33,3)	8 (44,4)
FOP + stato procoagulativo (trombofilia ereditaria in 8, neoplasia in 1)	4 (44,4)	5 (27,8)

delle forme a basso rischio embolico (77,7% vs 72,2%); analizzando più nel particolare questo sottogruppo non erano presenti ulteriori fattori di rischio vascolare ($p = 0,035$) in 5/7 soggetti con meno di 45 anni (71,4%; 3 con FOP + aneurisma del setto interatriale, e 2 con FOP + trombofilia ereditaria) ed in 3/13 soggetti ≥ 45 anni (23,1%; 2 con FOP + aneurisma del setto interatriale, e 1 con FOP + trombofilia ereditaria). Nei restanti pazienti erano invece presenti fattori di rischio vascolare aggiuntivi.

Il monitoraggio del ritmo cardiaco eseguito durante la degenza ospedaliera ha consentito di porre la diagnosi di fibrillazione atriale in 4 pazienti, tutti appartenenti al gruppo di età più elevata. Al contrario, cause più rare di cardioembolia, quali la cardiopatía aritmogena del

ventricolo destro ed una valvulopatia in esito di un intervento per tetralogia di Fallot, erano rappresentate solo tra i pazienti più giovani.

La malattia del piccolo vaso era poco rappresentata tra i più giovani, essendo responsabile del 6,2% delle ischemie insorte < 45 anni e del 16,4% delle ischemie insorte nei pazienti più anziani ($p = 0,104$). Questa categoria eziopatogenetica TOAST è stata confrontata con il dato neuroradiologico di infarto di tipo lacunare.

Nei soggetti giovani erano stati documentati 6 infarti di tipo lacunare: tra questi 2 corrispondono ai soggetti con malattia del piccolo vaso, 2 sono stati attribuiti a MFE 2 ad una causa cardioembolica, data la completa assenza di fattori di rischio tradizionale e la concomitante associazione di FOP + coagulopatia ereditaria. Nei soggetti con oltre 45 anni erano stati invece documentati 21 infarti di tipo lacunare: accanto ai 14 pazienti con eziopatogenesi TOAST da malattia del piccolo vaso, risultano 4 pazienti ad eziopatogenesi indeterminata per assenza di fattori di rischio, 2 pazienti con presenza di 2 o più possibili cause (cardioembolia in un soggetto e aterosclerosi carotidea in un altro) ed 1 paziente con MF.

Una differenza statisticamente significativa è stata individuata in merito alla frequenza degli ictus da altra causa identificata, che costituivano il 34,4% delle diagnosi nei soggetti < 45 anni ed il 13,2% delle diagnosi nei soggetti ≥ 45 anni, con una $p = 0,011$. Il dettaglio delle diagnosi che sono state formulate è riportato in tabella 5.

La gran parte dei pazienti in entrambe le fasce di età, risultava affetta da dissecazione dei vasi cerebroafferenti, in particolare le dissecazione di carotide e di vertebrale erano ugualmente rappresentate nei pazienti più giovani rappresentando ciascuna il 36,4% delle altre cause note, mentre tra i pazienti più anziani era più frequente la dissecazione carotidea, che da sola rappresentava il 70% delle cause di ictus di questa categoria.

Tabella 5. Descrizione delle altre cause determinate di ischemia cerebrale in accordo alle due differenti fasce di età (*cut off* 45 anni)

	Soggetti < 45 anni N. 11 (%)	Soggetti ≥ 45 anni N. 10 (%)
Dissecazione carotidea	4 (36,4)	7 (70,0)
Dissecazione vertebrale	4 (36,4)	1 (10,0)
Malattia di Fabry	2 (18,2)	1 (10,0)
Cocaina+Tx antiretrovirale	1 (9,1)	0 (0,0)
Moya Moya	0 (0,0)	1(10,0)

E' stato possibile identificare un trauma cranio-cervicale nei giorni precedenti l'esordio dell'ischemia cerebrale in 7/16 (43,8%) casi di dissecazione cervicale, ugualmente distribuiti nei due gruppi. Negli altri pazienti la dissecazione è stata classificata come spontanea.

Data la natura del progetto primario, volto all'identificazione sistematica dei pazienti con MF, 3 ulteriori pazienti (2 nella categoria < 45 anni, ed 1 nella categoria superiore) sono risultati portatori di questa condizione monogenica.

Le ultime 2 diagnosi specifiche che sono state individuate sono state assunzione di droghe ad azione simpatico-mimetica in un paziente < 45 anni, HIV positivo ed in trattamento antiretrovirale, e sindrome di Moya Moya in una paziente con ≥ 45 anni.

L'ischemia cerebrale da causa criptogenica ha presentato una distribuzione abbastanza sovrapponibile nei due gruppi di pazienti. Nei soggetti con < 45 anni l'eziopatogenesi TOAST indeterminata è risultata responsabile del 21,9% degli eventi, mentre nei soggetti con oltre i 45 anni rappresentava il 34,2% degli eventi ($p = 0,204$). Escludendo i pazienti con TIA da causa indeterminata (3 dei pazienti più giovani ed 7 tra quelli più anziani), tutti i pazienti con ictus da causa criptogenica ed età < 45 anni presentavano un infarto di tipo territoriale (in 3 casi in territorio carotideo, ed in 1 caso a sede occipitale), mentre tra i soggetti con età ≥ 45

anni il 21,0% dei casi era sostenuto da infarti di tipo lacunare ed il 79,0% da infarti di tipo territoriale (11 in territorio carotideo e 4 in territorio vertebrobasilare).

In questa popolazione di pazienti con ischemia cerebrale, 81 pazienti (75,0%) erano ammessi per un primo episodio, mentre in 27 pazienti (25,0%) l'evento era recidivante.

Nella categoria < 45 anni i 5 pazienti con ischemia recidivante (15,6%; maschi: 1, età media $39,2 \pm 5,3$ DS) erano tutti ammessi per ictus cerebrale, ed in particolare risultavano affetti da ictus criptogenico in un caso, ictus da altra eziologia nota in 3 casi (2 pazienti con MF ed 1 paziente con dissecazione vascolare), ictus cardioembolico in 1 caso (FOP con trombofilia ereditaria). Fatta l'eccezione della paziente con dissecazione vascolare, che aveva presentato un TIA (amaurosi fugace) 15 giorni prima dell'ictus indice, gli altri 4 pazienti avevano sofferto tutti di precedenti ictus ischemici, di tipo lacunare in 3 pazienti (le pazienti con Malattia di Fabry e la paziente con FOP + lipoproteina (a)), e di tipo territoriale nel maschio. Quest'ultimo paziente si è ricoverato per un ictus da occlusione del TOP dell'arteria basilare che è stato la causa del suo decesso. L'età media di questi 5 pazienti all'esordio del primo evento ischemico era $31,3 \pm 5,0$ DS.

Nella categoria ≥ 45 anni, 22 pazienti (28,9%; maschi: 15 = 68,2%; età media $53,5 \pm 4,4$ DS) avevano presentato un evento ricorrente. L'evento indice era stato un TIA in 3 soggetti: un paziente con aterosclerosi carotidea che aveva presentato un precedente TIA 7 giorni prima del ricovero e 2 pazienti con TIA da causa indeterminata, di cui 1 caso con due precedenti ricoveri per TIA (in questa paziente è stata condotta un'analisi del gene NOTCH3 nel sospetto di CADASIL, che ha condotto all'identificazione di una variante intronica di significato patogenetico da definire), ed 1 caso con un precedente ictus ischemico da dissecazione vascolare. Nei 19 soggetti con pregresso ictus ischemico 7 pazienti avevano presentato un ictus da causa indeterminata (criptogenica in 5, da due o più cause in 2), 5 pazienti presentavano una malattia del piccolo vaso cerebrale, 4 pazienti un ictus di tipo

cardioembolico, 3 pazienti un ictus da aterosclerosi carotidea, 1 paziente era affetto da MF. In 10 pazienti l'ictus recidivante era di tipo lacunare (oltre ai pazienti con malattia del piccolo vaso e con MF, 4 pazienti con ictus di tipo indeterminato, di cui 1 con ictus da due o più cause (lacune+ aterosclerosi carotidea). Nei 9 pazienti con ictus territoriale l'eziopatogenesi cardioembolica era stata individuata in 4 pazienti, quella indeterminata in 3 e quella da malattia dei grossi vasi in 2 soggetti. Una paziente con ictus cardioembolico recidivante è deceduta a causa della patologia cerebrovascolare. L'età media al momento dell'esordio del primo evento ischemico (TIA o ictus) era $52,5 \pm 7,8$ DS, significativamente più alta rispetto a quella della categoria di pazienti con < 45 anni ($p < 0,001$). Non sono state documentate differenze nella frequenza di ischemia cerebrale da eziopatogenesi indeterminata tra eventi ricorrenti e non (37,0% vs 30,1% rispettivamente; $p = 0,553$).

Poco più del 20% dei pazienti con ictus ischemico giovanile arruolati per questo progetto ha beneficiato dei trattamenti della fase acuta (trombolisi endovenosa con r-TPA o trattamento endovascolare), in assenza di differenze significative tra le due fasce di età (20,7% vs 25,8%).

Discussione:

In questo studio monocentrico le eziopatogenesi più frequentemente individuate per l'ischemia cerebrale in età giovanile sono risultate la cardioembolia (25,0%, principalmente costituita da fonti a basso rischio embolico) e le altre cause determinate (19,4%), mentre la malattia del piccolo vaso (15,7%) e la malattia delle grandi arterie intra- o extracraniche (9,2%) erano meno rappresentate. Nel 31,5% dei pazienti non è stato possibile identificare la causa dell'ictus o del TIA, nonostante i pazienti avessero subito un approfondito percorso diagnostico in un *setting* di alta specializzazione (cliniche universitarie). Questi dati

eziopatogenetici risultano sostanzialmente in linea con quanto riportato nella letteratura internazionale; ad esempio in un recente lavoro multicentrico, pubblicato da Yersilot Barlas et al. nel 2013¹⁶, coinvolgente 15 cliniche ospedaliere in differenti paesi europei, per un totale di 3331 pazienti, venivano riportate frequenze abbastanza sovrapponibili (altre cause determinate 22%, cardioembolia 17%, malattia del piccolo vaso 12%, aterosclerosi dei grossi vasi 9%), ed in un secondo grande trial multicentrico europeo sulla prevalenza della malattia di Fabry nei pazienti con ictus giovanile, il SIFAP study⁶⁻⁷, pubblicato nel 2013 da Rolfs et al. e coinvolgente 5023 pazienti di cui 3291 con ictus ischemico, le frequenze riportate risultavano (altre cause determinate 17,8%, cardioembolia 16,7%, malattia del piccolo vaso 13,5%, aterosclerosi dei grossi vasi 18,6%). Questi dati ci invitano a riflettere sul fatto che nel nostro studio, così come nei due lavori multicentrici menzionati, la maggior parte dei pazienti con ictus giovanile presenta un'eziopatogenesi indeterminata. La frequenza superiore della cardioembolia nella nostra casistica potrebbe essere legata alla presenza di un elevato numero di pazienti con ictus legato al forame ovale pervio, che rappresenta circa il 70% delle fonti cardioemboliche del nostro campione. Essendo il FOP un reperto cardiaco altamente prevalente nella popolazione generale, in un certo sottogruppo dei pazienti con ischemia cardiogena la sua presenza potrebbe essere incidentale. Infatti la cardioembolia da FOP è ritenuta causa rilevante di ictus giovanile soprattutto in assenza di altri fattori di rischio vascolare, condizione che si realizzava solamente nel 29,6% del campione con FOP.

La nostra analisi statistica ha documentato differenze significative nelle due fasce di età esaminate (soggetti < 45 anni o soggetti ≥ 45 anni), sia in merito a fattori demografici che alla distribuzione dei fattori di rischio vascolare e dell'eziopatogenesi TOAST.

Innanzitutto abbiamo riscontrato una prevalenza del sesso femminile nella fascia di età più bassa (56% vs 32%). Questa predominanza del sesso femminile tra i pazienti con ictus giovanile, soprattutto nelle fasce di età più basse, è già nota da tempo⁴⁻⁵, ed è stata legata a

fattori ormonali, assunzione di estroprogestinici ed emicrania. Il nostro studio non ci ha permesso di evidenziare il ruolo dell'emicrania nella nostra serie ospedaliera, non essendo stata inclusa una valutazione sistematica per questa patologia al momento della raccolta dei dati. Gli estroprogestinici erano assunti dal 14,3% delle donne del campione, con un trend per una maggiore assunzione dei contraccettivi nella fascia di età inferiore (22,2% vs 8,3%). Gli estroprogestinici erano associati ad una trombofilia ereditaria solamente in 1/3 delle pazienti (2/6), entrambe con età ≥ 45 anni. Nei restanti casi era presente un'associazione con fumo in una paziente, mentre nelle altre non erano presenti fattori di rischio aggiuntivi.

I pazienti con < 45 anni di età tendevano a presentare al momento del ricovero una maggiore gravità dell'ischemia cerebrale, ma anche un miglioramento clinico di maggiore entità, cosicché il punteggio alla NIHSS della dimissione era tendenzialmente più basso. Questo dato non era legato ad una maggiore frequenza di TIA (9,4% vs 18,4% dei più anziani), ed infatti il trend veniva confermato anche analizzando esclusivamente la sottopopolazione con ictus ischemico. Inoltre non abbiamo documentato una maggiore somministrazione di trattamenti della fase acuta (trombolisi endovenosa e trattamento endovascolare) nella categoria di pazienti più giovani (20,7% vs 25,8%). Una possibile spiegazione di questo esito potrebbe essere legata a differenze nell'eziopatogenesi dell'ictus nelle due fasce di età. Tra i pazienti più giovani prevalgono infatti le "altre cause determinate" di ischemia, tra cui dissecazioni vascolari (70,0%) e MF (18,2%). E' noto che l'ictus, in entrambe le patologie, è generalmente associato ad una buona prognosi a distanza. Lee et al.¹⁸⁶ hanno condotto uno studio di popolazione per misurare incidenza e prognosi della dissecazione arteriosa cervicale, documentando in una serie di 48 pazienti un buon recupero funzionale, dopo adeguato trattamento, nel 92% dei casi. Anche nella MF è stato osservato, durante le fasi iniziali della malattia, un buon recupero funzionale in pressoché tutti i pazienti colpiti da ischemia cerebrale, anche se con l'aumentare degli anni questa capacità di recupero viene persa

(Borsini W. comunicazione personale). Di fatto la proporzione di soggetti con una di queste due diagnosi differiva in modo statisticamente significativo tra pazienti con o senza miglioramento clinico (27,5% vs 5,1%, $p = 0,001$).

Per quanto concerne l'analisi dei fattori di rischio, abbiamo riscontrato come la gran parte dei pazienti della nostra serie ospedaliera presentava almeno uno di essi. Pur essendo presente una differenza statisticamente significativa tra le 2 fasce di età verso una minore frequenza dei fattori di rischio tra i soggetti con < 45 anni, anche i pazienti di questa categoria presentavano in un'alta percentuale (68,7%) almeno uno dei cosiddetti fattori di rischio vascolare tradizionali. Quindi le strategie di prevenzione primaria di questa fascia di età non differiscono molto da quelle dell'ictus nelle età più avanzate e senile, dovendo incentrarsi principalmente nella diagnosi e terapia di ipertensione arteriosa, dislipidemia, sovrappeso corporeo, diabete mellito, tabagismo, iperomocisteinemia. D'altra parte nei soggetti più giovani sembrano necessarie anche misure più specificatamente mirate al controllo di alcuni fattori specifici, quale ad es. l'abuso alcolico.

Le differenze circa l'eziopatogenesi TOAST dell'ischemia cerebrale nelle due fasce di età riscontrate nella nostra analisi confermano quanto recentemente riportato da Yersilot Barlas et al.¹⁶ con una prevalenza dell'aterosclerosi delle grandi arterie intra- ed extracraniche e della malattia del piccolo vaso tra i pazienti più anziani e della cardioembolia e delle altre eziologie determinate tra i pazienti più giovani (anche se viene raggiunta la significatività statistica solamente per quest'ultima categoria TOAST). In merito alla cardioembolia abbiamo individuato durante il ricovero ospedaliero una fibrillazione atriale solamente in 4 (3,9%) pazienti con ≥ 45 anni. Anche nel lavoro precedentemente citato era stata individuata una fibrillazione atriale in modo statisticamente significativo soprattutto nei pazienti più anziani¹⁶.

Se consideriamo invece l'eziopatogenesi indeterminata, la totalità dei pazienti con < 45 anni ed il 79% dei pazienti più anziani presentavano al neuroimaging infarti territoriali,

coinvolgenti la corteccia cerebrale. E' possibile che il meccanismo che ha condotto a questo tipo di lesione sia stato di tipo embolico e che la transitorietà di un'aritmia cardiaca responsabile dell'embolia non ne abbia permesso l'identificazione. Lo studio dei vasi cerebrali con angio TC ed angio RMN era stato infatti condotto in tutti i pazienti e non aveva rilevato alcuna patologia primitiva delle arterie cerebrali, così come non era stato possibile identificare cause disimmuni di ictus in nessun paziente. Inoltre è possibile che i pazienti che presentavano infarti lacunari in assenza di fattori di rischio vascolare fossero affetti da una delle microangiopatie ereditarie cerebrali, ma la scarsa esperienza clinica che ancora abbiamo con la gran parte di esse (con l'eccezione della CADASIL) e le difficoltà legate all'esecuzione delle indagini genetiche necessarie a confermarle rendono ancora poco frequente l'attivazione dei percorsi necessari ad escludere la loro presenza.

Un'ultima considerazione riguarda la ricorrenza di ischemia cerebrale in età giovanile, che si era verificata in 27/108 soggetti. In una minoranza di casi (1 paziente con < 45 anni e 3 pazienti con \geq 45 anni) gli eventi ischemici precedenti erano costituiti da 1 o più TIA. Escludendo questi pazienti la frequenza dell'ictus ischemico recidivante della nostra casistica risultava essere del 12,5% tra i pazienti più giovani e del 25% tra quelli più anziani, in accordo con la nozione che l'incrementare dell'età è uno dei predittori già noti di ricorrenza ischemica in età giovanile, accanto a diabete mellito, aterosclerosi carotidea e pregresso TIA, ed insufficienza cardiaca¹⁸⁷. La frequenza di ricorrenza individuata nel nostro campione è piuttosto alta; in uno studio longitudinale condotto da Putaala et al.¹⁸⁷ nel 2010 veniva documentato che il 9,4% dei pazienti con primo ictus ed età < 50 anni recidivava a 5 anni; i nostri tassi di ricorrenza sono leggermente più alti, ma non sono possibili confronti diretti, data la diversa natura dei due lavori (il primo longitudinale prospettico, il secondo trasversale retrospettivo).

Conclusioni:

La nostra analisi si inserisce in un filone di ricerca attuale ed internazionale, inerente le caratteristiche cliniche, eziopatogenetiche e prognostiche dell'ischemia cerebrale in età giovanile (< 45 anni).

Dai nostri dati emerge che l'ictus può presentare anche in età giovanile una gravità moderatamente alta, ma nella gran parte dei pazienti è possibile assistere ad un significativo miglioramento clinico, in parte legato al meccanismo patogenetico di base.

Le caratteristiche peculiari dell'ischemia cerebrale giovanile concernono principalmente la prevalenza del sesso femminile, la presenza di fattori di rischio "non tradizionali", quali abuso di sostanze, estroprogestinici, trombofilie ereditarie, ed una maggiore frequenza della categoria TOAST "altre diagnosi determinate", sostenuta principalmente dall'insorgenza di dissecazione arteriosa. Sono tuttavia molto rappresentati anche nel giovane i fattori di rischio vascolare tradizionale, e pertanto le strategie di prevenzione primaria dell'ictus in questa fascia di età sono in gran parte analoghe a quelle per l'ictus senile.

In circa 1/3 dei pazienti non è possibile identificare una causa specifica dell'ischemia cerebrale; in gran parte dei casi criptogenici la presenza di infarti territoriali corticali sembrerebbe indicare una possibile eziopatogenesi embolica, forse sostenuta da aritmie transitorie di difficile identificazione.

Solo 1/5 dei pazienti con ictus giovanile beneficia attualmente dei più avanzati trattamenti della fase acuta, quali la trombolisi endovenosa; risulta pertanto necessario incrementare anche in questa fascia di età la conoscenza dei sintomi dell'ischemia cerebrale e la necessità di attivare rapidamente i servizi di emergenza territoriale per il corretto inquadramento diagnostico e terapeutico.

II Sezione sperimentale:

**Interessamento cerebrovascolare in corso di malattia
di Fabry**

Ictus ischemico cerebrale in corso di malattia di Fabry: frequenza, caratteristiche clinico-radiologiche e risposta alla terapia enzimatica sostitutiva in una serie di 57 pazienti italiani in follow up neurologico presso il Centro di riferimento per la malattia di Fabry dell'azienda ospedaliero-universitaria Careggi, Firenze

Background ed obiettivo dello studio:

Come discusso nella sezione introduttiva di questa tesi, l'ictus è una grave e disabilitante complicazione della malattia di Fabry (MF) e generalmente insorge in età giovanile, sia in conseguenza del coinvolgimento primario dei vasi cerebrali, che come complicazione della malattia cardiaca^{134, 151-152}. L'ictus è inoltre frequentemente il primo evento che conduce i pazienti con MF all'attenzione del medico¹⁵¹, a meno che i sintomi più precoci della malattia, quali l'angiocheratoma corporis diffusum, le acroparestesie dolorose o la proteinuria non siano stati correttamente diagnosticati durante l'epoca infantile, ed è quindi una prima opportunità per la diagnosi specifica di MF. E' ragionevole attendere un ictus in circa il 25% dei pazienti Fabry¹⁴⁶⁻¹⁵⁰, anche se due registri internazionali multicentrici, promossi dalle aziende farmaceutiche dopo la commercializzazione della terapia enzimatica sostitutiva (ERT)¹⁵¹⁻¹⁵², hanno documentato prevalenze inferiori.

Nonostante l'elevata frequenza dell'ictus in corso di MF sono ad oggi disponibili poche informazioni circa la sua caratterizzazione clinica^{78, 134-135, 151-152}.

Sono inoltre disponibili pochi dati circa la sicurezza ed efficacia della terapia enzimatica sostitutiva (ERT) nella prevenzione primaria o secondaria dell'ictus ischemico in corso di MF¹¹¹⁻¹¹³.

Obiettivo dello studio è la descrizione della frequenza e delle caratteristiche clinico-radiologiche dell'ictus ischemico in una coorte di 57 pazienti italiani affetti da MF in follow up neuroradiologico presso il Centro di riferimento per la MF dell'AOUC. Particolare attenzione è stata dedicata all'analisi delle caratteristiche di neuroimaging ed alla risposta alla terapia enzimatica sostitutiva.

Metodi:

Il Centro di riferimento per la Malattia di Fabry dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi (AOUC) Firenze, è costituito da un team multidisciplinare con *expertise* nella MF, che include genetisti, biochimici, biologi, neurologi, cardiologi, nefrologi, oculisti, dermatologi, immunologi ed uno psicologo. Afferiscono al Centro di riferimento dell'AOUC pazienti con diagnosi biochimica e genetica di MF ed età ≥ 18 anni; i pazienti pediatrici sono seguiti presso l'Unità di malattie Metaboliche dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, con cui esiste una stretta collaborazione.

All'interno del Centro di riferimento esistono due tipi di percorso: per i pazienti provenienti dall'area vasta fiorentina e dalle province di Arezzo e Siena, o per pazienti di altre città che lo richiedano, viene adottato un protocollo di presa in carico totale; questi pazienti eseguono, se indicate, le infusioni quindicinali di ERT presso l'AOUC (c/o le S.O.D. di Immunoallergologia o Neurologia 2), ed un protocollo di monitoraggio standardizzato multidisciplinare. I pazienti provenienti da altre province della regione Toscana o da altre regioni italiane possono eseguire un follow up più selettivo, ad es. esclusivamente neurologico, in relazione alle richieste del Centro di riferimento che ha primariamente in carico il paziente.

Negli anni in cui si è svolto questo Dottorato di Ricerca, tra il 2011 ed il 2013, sono stati sottoposti a follow up neurologico 57 pazienti con MF (di cui 32 con presa in carico totale).

Il monitoraggio neurologico prevede l'esecuzione di una visita specialistica neurologica, comprensiva di esame obiettivo generale e neurologico, e misurazione, nei pazienti con pregressa sintomatologia cerebrovascolare, della gravità dei sintomi di ictus e della disabilità residua mediante somministrazione delle scale NIHSS¹⁷² e mRS¹⁷⁴. Per ogni evento cerebrovascolare ischemico vengono raccolti inoltre la classificazione clinica OCSF¹⁸⁸ e la presunta eziopatogenesi (occlusione di piccolo vaso, cardioembolia, atero-embolia, infarto emodinamico, dissecazione, indeterminato). Ad ogni visita neurologica sono stati controllati in modo sistematico tutti i fattori di rischio vascolare modificabili (anche mediante visione dei diari dell'ipertensione e degli esami ematici di controllo), è stata valutata la presenza di dolore neuropatico o di cefalea e la risposta alle terapie specifiche e sintomatiche, e sono stati raccolti gli eventi clinici significativi occorsi dalla precedente visita, sia di tipo neurologico che sistemico. Le visite di monitoraggio neurologico vengono effettuate con cadenza annuale nei pazienti asintomatici dal punto di vista cerebrovascolare e neuropatico, e semestrale nei pazienti sintomatici o scarsamente controllati dalla terapia. Sono state comunque effettuate visite neurologiche "extra" protocollo ogni volta che il paziente o un altro specialista che aveva valutato il caso le richiedeva (ad es. per la presenza di un nuovo sintomo).

Gli esami strumentali eseguiti in modo standardizzato sono stati:

- 1) ENG/EMG: questo esame è stato eseguito al momento della prima stadiazione nei pazienti con MF di nuova diagnosi e ripetuto qualora alla visita neurologica emergeva una specifica indicazione (sospetta comparsa di neuropatia compressiva, ad es. la sindrome del tunnel carpale, o di neuropatia delle grosse fibre, ad es. in conseguenza della dialisi e dell'insufficienza renale cronica). Tutti gli esami sono stati eseguiti da Neurofisiopatologi operanti presso la S.O.D. di Neurofisiopatologia dell'AOUC.

- 2) RMN encefalo, con sequenze T1 sagittali, T2 longitudinali, FLAIR assiali, GRE assiali, DWI assiali: questo esame è stato eseguito al momento della prima stadiazione nei pazienti con MF di nuova diagnosi e ripetuto ogni 2 anni per monitoraggio. Tutti gli esami sono stati eseguiti con un protocollo standardizzato concordato con la U.O. di Neuroradiologia dell'AOUC. Esami "extra" protocollo sono stati eseguiti in caso di specifiche indicazioni (ad es. sospetta recidiva cerebrovascolare, cefalea atipica).
- 3) Angio RMN del poligono di Willis: questo esame è stato eseguito al momento della prima stadiazione nei pazienti con MF di nuova diagnosi e ripetuto ogni 2 anni per monitoraggio. Tutti gli esami sono stati eseguiti con un protocollo standardizzato concordato con la U.O. di Neuroradiologia dell'AOUC.
- 4) Ecocolordoppler tronchi sopraaortici: questo esame è stato eseguito al momento della prima stadiazione nei pazienti con MF di nuova diagnosi e ripetuto ogni 2 anni per monitoraggio. Tutti gli esami sono stati eseguiti da Neurosonologi operanti presso la S.O.D. di Neurofisiopatologia dell'AOUC.

Tutti i pazienti hanno eseguito esami ematici ed urinari a cadenza semestrale, comprensivi di glicemia, emocromo con formula, creatinina, azotemia, eGFR, transaminasi, colesterolo totale, HDL e trigliceridi, ac. Urico, omocisteina, esame urine, microalbuminuria e proteinuria delle 24 ore.

In un sottogruppo di pazienti con indicazione clinica (pazienti con nuova diagnosi di MF che eseguivano la prima stadiazione di malattia per valutare il livello di danno basale e l'eventuale indicazione alla ERT) è stata eseguita una biopsia di cute per la diagnosi di neuropatia delle piccole fibre nervose in collaborazione con il prof. R. Liguori ed il dr. V. Donadio del Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale Bellaria-Maggiore di Bologna.

Per le finalità specifiche di questo progetto di ricerca, inerente la frequenza e le caratteristiche clinico-radiologiche dell'ictus ischemico nella serie clinica di pazienti con MF in follow up neurologico, sono state raccolte in modo sistematico in un database informatico appositamente costruito i seguenti parametri: sesso, età, probando, motivo della diagnosi, mutazione, attività leucocitaria di α -GAL A, fattori di rischio, ERT, fenotipo Fabry sistemico (acroparestesie dolorose febbrili episodiche o continue, angiocheratoma corporis, cornea verticillata, ipoacusia neurosensoriale, labirintopatia deficitaria, cefalea emicranica o tensiva, proteinuria, creatinina, eGFR, cardiopatia ipertrofica, angina pectoris o IMA, aritmie cardiache, posizionamento di pace maker), fenotipo Fabry cerebrovascolare (caratteristiche dell'ultimo TIA/ictus ischemico: da un punto di vista clinico – sintomi, classificazione OCSF, NIHSS, mRS, età al momento dell'evento, ricorrenza, meccanismo eziopatogenetico – e radiologico - sede della lesione, tipologia lacunare o territoriale dell'infarto - ; presenza di leucoencefalopatia e stima della sua gravità alla Fazekas scale, presenza e numero degli esiti lacunari o territoriali distinti dall'ultimo ictus, presenza di tortuosità dell'arteria basilare, presenza di *cerebral microbleeds* (CMBs), presenza del segno del pulvinar).

I CMBs sono stati diagnosticati dal Neuroradiologo al momento della refertazione delle immagini della RMN encefalo di follow up. Sono stati definiti secondo la definizione radiologica standard, quali lesioni ipointense scarsamente visibili o non visibili nelle immagini T1 e T2 pesate, con effetto blooming alle sequenze GRE. Le lesioni dovevano avere un aspetto rotondeggiante, margini definiti, diametro < 1 cm ed essere circondate da parenchima cerebrale per la quasi totalità del perimetro. E' stata raccolta la localizzazione infratentoriale, profonda o lobare dei CMBs.

La tortuosità dell'arteria basilare è stata valutata dalla candidata come presente all'esame di angioRMN qualora l'arteria presentasse un decorso scoliotico (> 1 curva).

Per ogni paziente sono state raccolte informazioni sulla terapia in atto al momento dell'esecuzione della RMN di follow up (antitrombotici, ACE inibitori o sartanici, statine).

Analisi statistica:

I dati demografici e clinici sono stati riassunti in statistiche descrittive.

E' stato condotta un'analisi univariata di dati demografici, fattori di rischio, tipo di mutazione e attività di α -GAL A, fenotipo Fabry sistemico, fenotipo Fabry cerebrovascolare, terapie specifiche e sintomatiche in accordo alla presenza di ictus ischemico.

Abbiamo utilizzato il test T di Student per le variabili continue ed il test del Chi quadro per le variabili discrete. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati:

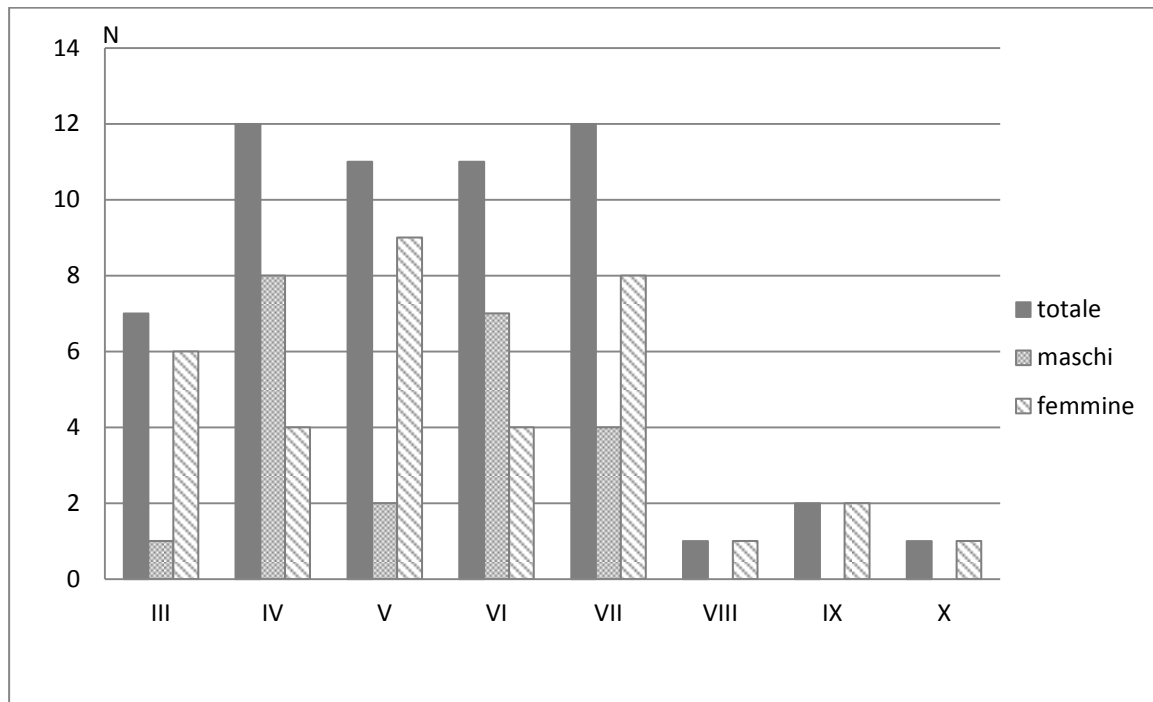
Dal 1 gennaio 2011 al 31 dicembre 2013 sono stati sottoposti a *follow up* neurologico periodico 57 pazienti affetti da MF (32 pazienti integralmente seguiti presso il Centro di riferimento per la Malattia di Fabry dell'AOUC e 25 pazienti provenienti da altri Centri di riferimento ed indirizzati presso i nostri ambulatori esclusivamente per il *follow up* neurologico).

La popolazione in studio era caratterizzata da un'età media all'ultima visita di 49,0 anni \pm 16,7 DS (minimo 20,3 anni, F; massimo 91,8 anni, F). Ventidue soggetti (37,9%) presentavano sesso maschile. In figura 1 è rappresentata la distribuzione dei pazienti in relazione alle differenti decadi di vita ed al sesso.

Dei 57 pazienti studiati 18 erano stati probandi (caso indice) delle loro famiglie. La sintomatologia che aveva condotto questi pazienti alla diagnosi era stata: angiocheratoma ed acroparestesie x4, proteinuria x2, ictus ischemico x4, insufficienza renale cronica x5,

cardiopatía ipertrofica x3. In 39 pazienti la diagnosi era stata invece formulata durante uno screening familiare.

Figura 1. Distribuzione dei 57 pazienti in relazione all'età (per decenni) ed al sesso.

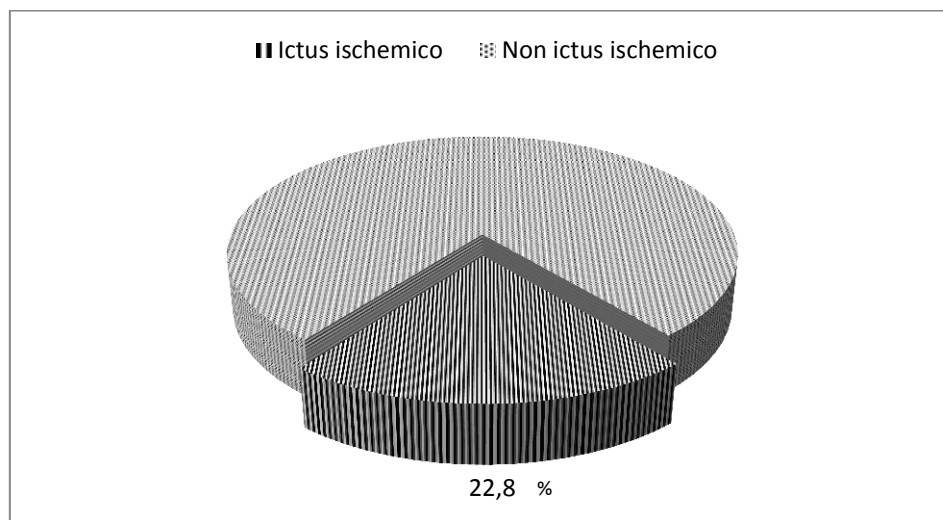


I 57 pazienti appartenevano a 24 differenti famiglie. Sono state individuate 19 differenti mutazioni del gene GLA in 21 famiglie per le quali era a disposizione del Centro di Riferimento di Firenze il risultato della genetica (totale 53 pazienti). Le mutazioni individuate erano di tipo *missense* nel 68,4% dei pazienti, *nonsense* nel 15,8% dei pazienti e *delezioni* nel 15,8% dei pazienti. Il valore medio dell'attività dell' α -galattosidasi A leucocitaria era nei maschi $0,8 \pm 1,2$ DS nMol/mg/h e nelle femmine $18,2 \pm 11,8$ DS (v.n. 20-65 nMol/mg/h).

Tredici pazienti (22,8%) avevano sofferto al momento dell'ultima visita di follow up di ≥ 1 ictus ischemico cerebrale. Nessun paziente della popolazione esaminata aveva presentato

episodi di emorragia parenchimale primitiva o subaracnoidea. Un unico paziente affetto da ictus ischemico aveva sviluppato anche due emorragie parenchimali secondarie (la prima conseguente ad un trauma cranico in corso di incidente stradale all'età di 6 anni, la seconda conseguente alla somministrazione di farmaco trombolitico (r-tPA) per il trattamento dell'ictus ischemico, a sede remota).

Figura 2. Frequenza dell'ictus ischemico cerebrale nella popolazione Fabry esaminata.



Le caratteristiche demografiche e la distribuzione delle mutazioni e dei valori dell'attività dell' α -galattosidasi A leucocitaria in relazione alla diagnosi di ictus ischemico sono riportate nel dettaglio in tabella 1.

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative in relazione all'età media dei due gruppi (55,2 vs 47,1 anni, $p=0,964$) né alla frequenza del sesso maschile (38,5 vs 37,8, $p=0,125$).

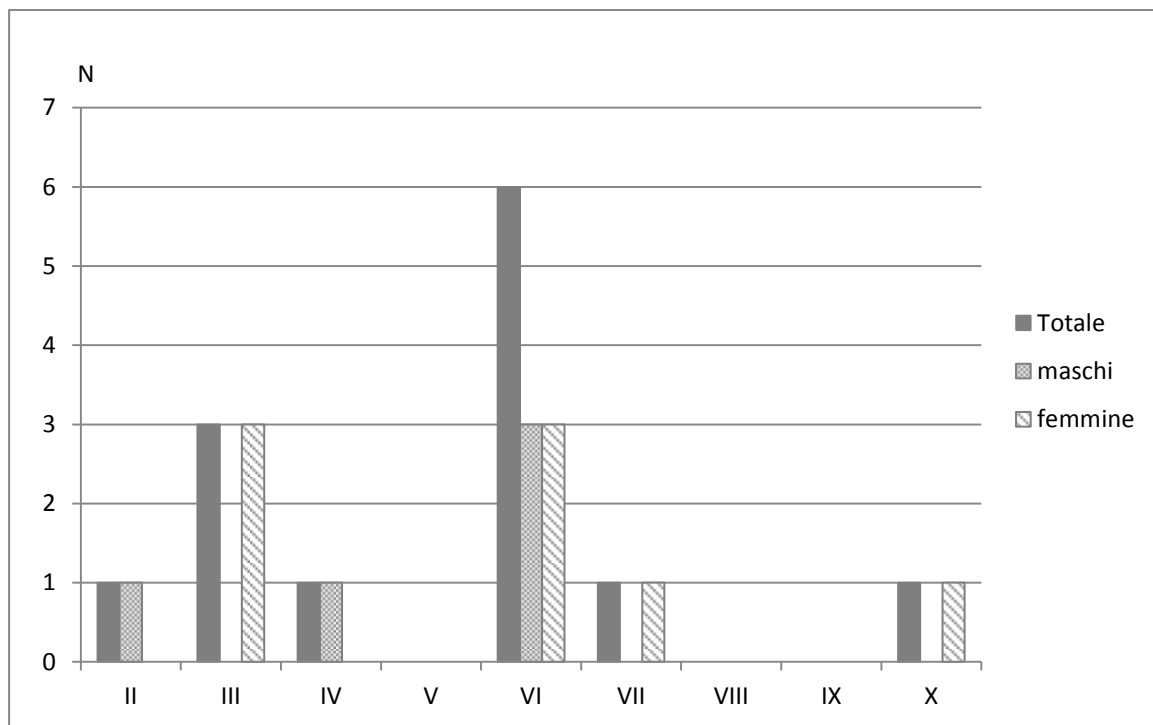
Tabella 1. Distribuzione delle caratteristiche demografiche, della tipologia di mutazioni e dei valori dell'attività dell' α -galattosidasi A leucocitaria in relazione alla diagnosi di ictus ischemico

	Totale Fabry N. 57	Ictus N. 13 (%)	Non Ictus N. 44 (%)
Maschi	22 (37,9)	5 (38,5)	17 (37,8)
Età media (DS)	49,0 (\pm 16,7)	55,2 (\pm 16,9)	47,1 (\pm 16,4)
Mutazioni missense n. (n. 53 Pz)			
p.Arg112Cys	1	1	0
p.Ala143Thr	2	0	2
p.Arg227Gln	1	1	0
p.Arg301Gly (x2fam)	6	1	5
p.Arg301Pro	5	2	3
p.Asn215Ser (x2fam)	9	0	9
p.Asp299Gly	2	0	2
p.Cys172Arg	1	0	1
p.Gly360Asp	5	1	4
p.Leu243Ser	4	1	3
p.Leu415Arg	1	1	0
p.Met1Val	3	1	2
p.Trp236Ser	1	0	1
Mutazioni nonsense n.			
p.Arg301X	1	0	1
p.Ser72X	2	0	2
p.Trp44X	2	1	1
Delezioni n.			
c.946delG	3	0	3
c.548-3_553del9	1	1	0
c.794delCT	3	2	1
α-GAL A (v.n. 20-65 nMol/mg/h)			
Maschi:	0,8 \pm 1,2	0,3 \pm 0,4	1,7 \pm 1,6
Femmine	18,2 \pm 11,8	17,0 \pm 13,2	19,1 \pm 11,3

I valori dell' α -galattosidasi A leucocitaria nei maschi con ictus tendevano ad essere più bassi rispetto ai maschi senza ictus (0,3 vs 1,7 nMol/mg/h, $p=0,071$).

L'età media di esordio dell'ictus ischemico era 47,2 anni \pm 19,7DS. L'esordio più precoce di ictus ischemico è stato in un paziente di 19,7 anni, mentre quello più tardivo in una paziente di 91,8 anni. La metà degli esordi di ictus risultava compresa tra i 27,9 e i 55,0 anni. Anche se nelle pazienti di sesso femminile si documentava un'età di esordio, sia come media che come mediana più avanzata rispetto ai maschi [media: 49,4 \pm 22,5 vs 43,6 \pm 16,0; mediana: 51,1 (IQT27,8-62,3) vs 44,0 (IQT 34,2-44,7)], questa differenza non risultava statisticamente significativa ($p=0,627$). I dettagli relativi alla distribuzione delle età di esordio dell'ictus in relazione a sesso e decade sono riportati in figura 3.

Figura 3. Descrizione dell'età di esordio dell'ictus ischemico in relazione al sesso e all'età (per decenni).



In 7 (53,8%) pazienti si era verificato ≥ 1 evento ricorrente, per un totale di 47 ictus ischemici. Di seguito sono riportate le caratteristiche cliniche e radiologiche inerenti l'ultimo evento ictale nei 13 pazienti studiati.

L'età media al momento dell'ultimo ictus ischemico era $51,5 \pm 17,2$ DS anni. In merito alla classificazione OCSF, 7 pazienti avevano presentato una sindrome POCS, 5 pazienti una sindrome LACS, 1 paziente una sindrome PACS. Il valore medio alla NIHSS al momento dell'esordio era $3,5 \pm 1,8$ DS anni. Alla dimissione ospedaliera i pazienti conseguivano un punteggio medio alla mRS di $1,9 \pm 1,6$ DS.

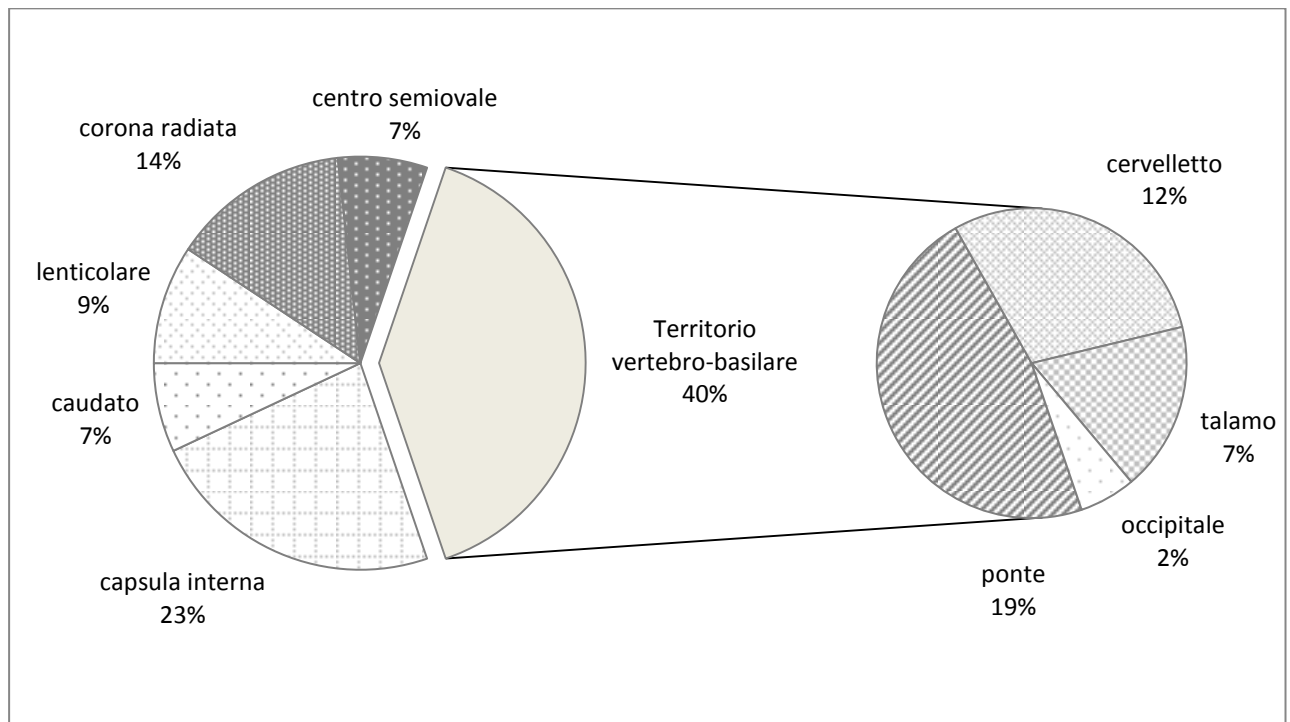
Lo studio di neuroimaging (n. 12 RMN + DWI, se non controindicata, n. 1 TC cranio) ha permesso di individuare la sede dell'infarto in 9 pazienti. Le localizzazioni relative all'ultimo ictus risultavano: ponte x3, cervelletto x1, talamo x1, capsula interna x1, caudato x2, corona radiata x1.

La sede dei pregressi 34 esiti infartuali risultava ponte x5, cervelletto x4, talamo x2, capsula interna x 9, lenticolare x4, corona radiata x5, centro semiovale x4, occipitale x1. La localizzazione dei 35 esiti infartuali (ultimo ictus + pregressi) è raffigurata in figura 4.

Tutti gli ictus cerebrali avevano morfologia lacunare con l'eccezione di 4 (8,5%) eventi (3 cerebellari ed 1 occipitale).

La leucoencefalopatia era presente in 12 (92,3%) pazienti. Una paziente di 26,5 anni con *first-ever stroke* in territorio vertebrobasilare non presentava leucoencefalopatia alla RMN encefalo. La gravità della leucoencefalopatia, misurata alla RMN secondo la *Fazekas scale* visiva, risultava essere: assente/lieve in 6 pazienti, moderata/grave in 6 pazienti.

Figura 4. Sede degli ictus ischemici nei 13 pazienti con malattia di Fabry in follow-up neurologico presso il Centro di riferimento per la malattia di Fabry dell'AOUC.



Sono stati riscontrati *cerebral microbleeds (CMBs)* in 3 (23,1%) pazienti con ictus ischemico, in tutti i casi a pressoché esclusiva localizzazione infratentoriale/profonda.

Un decorso tortuoso dell'arteria basilare è stato documentato in 10 (76,9%) pazienti.

Nessun paziente presentava il segno del pulvinar.

Non sono state documentate differenze significative in merito ai parametri clinici e radiologici di interessamento cerebrovascolare esaminati tra i 2 sessi. In tabella 2 sono riassunte le principali caratteristiche clinico-radiologiche descrittive del coinvolgimento cerebrovascolare nei due sessi.

Tabella 2. Caratteristiche clinico-radiologiche inerenti il coinvolgimento cerebrovascolare in accordo al sesso.

	Totale N. 13 (22,8%)	Maschi N. 5 (22,7%)	Femmine N. 8 (22,8%)	p
Età esordio ictus (\pm DS)	47,2 (\pm 19,7)	43,6 (\pm 16,0)	49,4 (\pm 22,5)	0,627
Età esordio minima	19,7	19,7	26,5	
Età esordio massima	91,8	55,1	91,8	
Età esordio mediana (IQT range)	51,0 (27,9-55,0)	44,0 (34,2-44,7)	51,1 (27,8-62,3)	
Ictus ricorrente	7 (53,8)	3 (60,0)	4 (50,0)	0,725
Età ultimo ictus (\pm DS)	51,5 (\pm 17,2)	47,2 (\pm 13,3)	54,1 (\pm 20,7)	0,523
OCSP				
POCS	7	3	4	
LACS	5	2	3	
PACS	1	0	1	
NIHSS esordio (\pm DS)	3,5 (\pm 1,8)	4,3 (\pm 1,8)	2,9 (\pm 1,5)	0,157
mRS dimissione (\pm DS)	1,9 (\pm 1,6)	2,6 (\pm 1,5)	1,5 (\pm 1,6)	0,243
Sede				
Ponte	3	2	1	
Cervelletto	1	1	0	
Talamo	1	0	1	
Capsula interna	1	0	1	
Caudato	2	1	1	
Corona radiata	1	1	0	
Non visualizzato	4	0	4	
Leucoencefalopatia (n.13)	12 (92,3)	5 (100,0)	7 (87,5)	0,411
Fazekas visiva (n.12 RMN)				
Assente	1	0	1	
Lieve	5	2	3	0,725*
Moderata	4	2	2	
Grave	2	1	1	
Microbleeds (n.12 RMN)	3 (23,1)	2 (40,0)	1 (12,5)	0,072
Profondi/infratentoriali	3	2	1	
Tortuosità BA (n.12 RMN)	10 (76,9)	4 (80,0)	6 (75,0)	0,835
Segno del pulvinar (n.12 RMN)	0	0	0	---

*Dicotomizzata: assente/lieve vs moderata/grave

Abbiamo condotto un'analisi univariata volta ad identificare le variabili associate ad ictus ischemico all'interno della popolazione di pazienti con MF sottoposti a follow-up neurologico in relazione a: 1) fenotipo clinico della MF; 2) caratteristiche neuroradiologiche; 3) fattori di rischio vascolare; 4) terapia enzimatica sostitutiva.

1) Analisi del fenotipo clinico sistemico "Fabry" in relazione alla presenza di ictus ischemico

Nella popolazione generale i sintomi precoci di MF, ovvero l'angiocheratoma corporis, le acroparestesie dolorose, l'ipoidrosi, gli episodi di ipertermia e la cornea verticillata erano presenti rispettivamente nel 36,8%, 49,1%, 33,3%, 10,5% e 43,8% (Tabella 3).

La prevalenza di questi sintomi era maggiore nei pazienti con ictus ischemico, ma un'associazione statisticamente significativa emergeva solamente per la cornea verticillata (79,9% vs 34,1%; p=0,006).

Tabella 3. Sintomi precoci di malattia di Fabry ed ictus ischemico cerebrale

	Totale Fabry N. 57	Ictus N. 13 (%)	Non Ictus N. 44 (%)	p
Angiocheratoma	21 (36,8)	7 (53,8)	14 (31,8)	0,148
Acroparestesie dolorose	28 (49,1)	8 (61,5)	20 (44,5)	0,308
Episodiche	25	7	18	
Continue	3	1	2	
Ipoidrosi	19 (33,3)	6 (46,1)	13 (29,6)	0,264
Ipertermia	6 (10,5)	2 (15,4)	4 (9,1)	0,516
Cornea Verticillata	25 (43,8)	10 (79,9)	15 (34,1)	0,006

La frequenza dei sintomi neuro-otologici, ovvero ipoacusia neurosensoriale e vertigine/*dizziness* di origine periferica era, nella popolazione generale, rispettivamente il 40,3% ed il 38,6% (tabella 4). Un'associazione statisticamente significativa con l'ictus ischemico si documentava per l'ipoacusia neurosensoriale (76,9% vs 51,6%; p=0,002), ma era presente un trend, seppur non significativo, anche per la labirintopatia (61,5% vs 31,8% p=0,055).

Il 45,6% dei pazienti Fabry soffriva di cefalea, tra cui emicrania senza aura (10/26 pazienti cefalalgici, 38,5%), emicrania con aura (1/26 pazienti cefalalgici, 3,8%) e cefalea tensiva (15/26 pazienti cefalalgici, 57,7%) (tabella 4). Non sono state evidenziate associazioni statisticamente significative tra cefalea di qualsiasi tipo ed ictus, mentre i 2 sottotipi emicranici risultavano più rappresentati tra i pazienti con ictus (38,5% vs 13,6%; p=0,046).

Tabella 4. Sintomi neuro-otologici, cefalea ed ictus cerebrale

	Totale Fabry N. 57	Ictus N. 13 (%)	Non Ictus N. 44 (%)	p
Ipoacusia neurosensoriale	23 (40,3)	10 (76,9)	13 (29,6)	0,002
Vertigine/ <i>dizziness</i>	22 (38,6)	8 (61,5)	14 (31,8)	0,053
Cefalea	26 (45,6)	7 (53,8)	19 (43,2)	0,498
Emicrania senza aura	10	5	5	
Emicrania con aura	1	0	1	0,046[§]
Tensiva	15	2	13	

§ emicrania tutti tipi vs cefalea tensiva

In merito al coinvolgimento renale: una proteinuria > 150 mg/24 h era presente nel 31,6% dei pazienti analizzati, con un valore medio di 693,4±426,5 mg/24 h. Una proteinuria > 1000

mg/24 h era presente nel 3,5% dei pazienti (2 casi). Non sono state documentate associazioni significative tra proteinuria ed ictus cerebrale (tabella 5).

L'insufficienza renale cronica era presente nel 28,1% dei pazienti, ed un eGFR < 60 (stadio III-V) era presente nel 10,5%. Tre pazienti (5,3%) erano in dialisi al momento dell'ultimo follow up, mentre 2 pazienti (3,5%) erano stati sottoposti a trapianto renale. Non sono state riscontrate associazioni significative tra insufficienza renale ed ictus ischemico (tabella 5).

Tabella 5. Coinvolgimento renale ed ictus ischemico

	Totale Fabry N. 57	Ictus N. 13 (%)	Non Ictus N. 44 (%)	p
Proteinuria	18 (31,6)	3 (23,1)	14 (27,3)	0,805
mg/24 h	693,4 (±426,5)	589,6 (±375,7)	717,3 (±447,93)	0,353
proteinuria >1000 mg/24 h	2 (3,5%)	0 (0,0)	2 (4,5%)	0,434
Insufficienza renale cronica	16 (28,1)	4 (30,8)	12 (27,3)	0,771
Stadio I	0	0	0	
Stadio II	10	3	7	
Stadio III	2	0	2	0,704
Stadio IV	1	0	1	
Stadio V	3	1	2	
Dialisi	3 (5,3)	1 (7,7)	2 (4,5)	0,655
Trapianto renale	2 (3,5)	1 (7,7)	1 (2,3)	0,371

La cardiopatia ipertrofica era presente nel 56,1%, la dilatazione atriale sinistra nel 35,1%, l'angina pectoris/infarto miocardico nel 19,3%, le bradiaritmie nel 10,5% e le tachiaritmie nel 22,8% dei pazienti esaminati (tabella 6).

Pur essendo presente un trend verso una maggiore rappresentazione della cardiopatia ipertrofica tra i pazienti con ictus cerebrale (77,0% vs 50,0%; p=0,086) non erano presenti ulteriori differenze nei due gruppi di pazienti esaminati.

Tabella 6. Coinvolgimento cardiaco ed ictus ischemico.

	Totale Fabry N. 57	Ictus N. 13 (%)	Non Ictus N. 44 (%)	p
Cardiopatia ipertrofica	32 (56,1)	10 (77,0)	22 (50,0)	0,086
Dilatazione atrio sn	20 (35,1)	7 (53,8)	13 (29,5)	0,106
Angina/IMA	11 (19,3)	3 (23,1)	8 (18,2)	0,694
Bradiaritmie	6 (10,5)	1 (7,7)	5 (11,7)	0,705
BAV II/III	3 (5,3)	0 (0,0)	3 (6,8)	0,333
Tachiaritmie	13 (22,8)	3 (23,1)	10 (27,7)	0,979
FA	4 (7,0)	1 (7,7)	3 (6,8)	0,914
TVNS	2 (3,5)	1 (7,7)	1 (2,3)	0,371

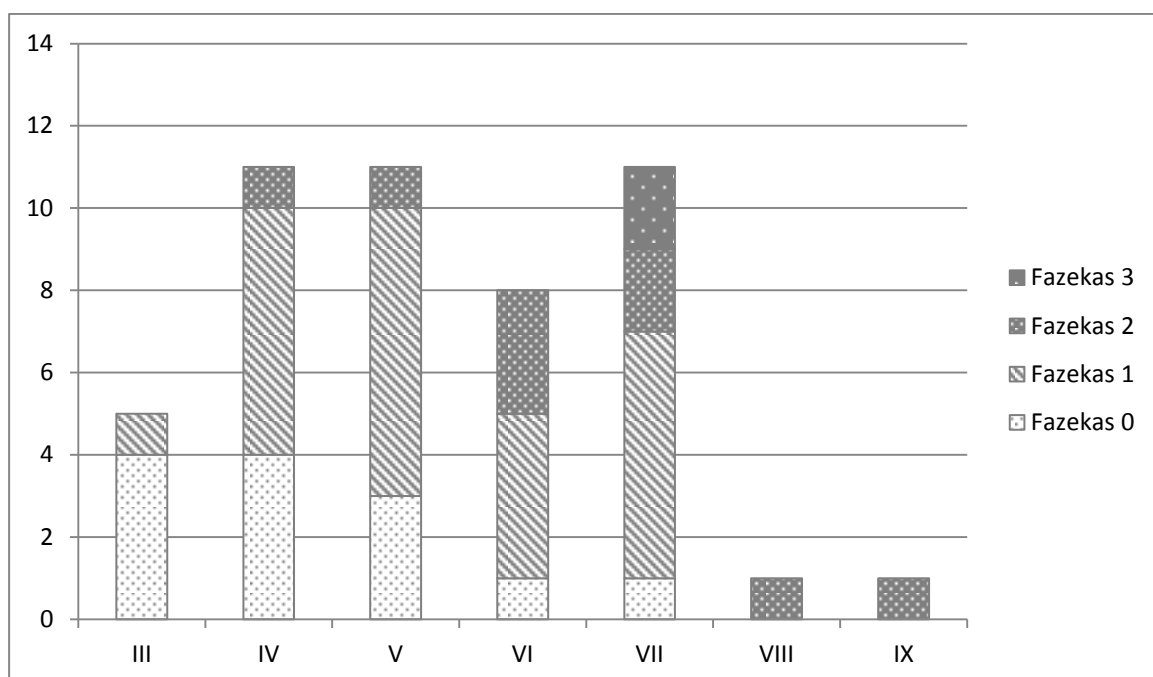
2) *Analisi delle caratteristiche neuroradiologiche in relazione alla presenza di ictus ischemico*

Sono stati analizzate le immagini di RMN encefalo + angio Willis di 48 pazienti (12 con ictus e 36 senza) e le immagini di TC cranio di 3 pazienti portatori di PM (1 con ictus e 2 senza).

In 6 pazienti residenti fuori regione e non affetti da ictus ischemico non è stato possibile visualizzare le immagini neuroradiologiche richieste; tali pazienti sono stati pertanto esclusi dall'analisi.

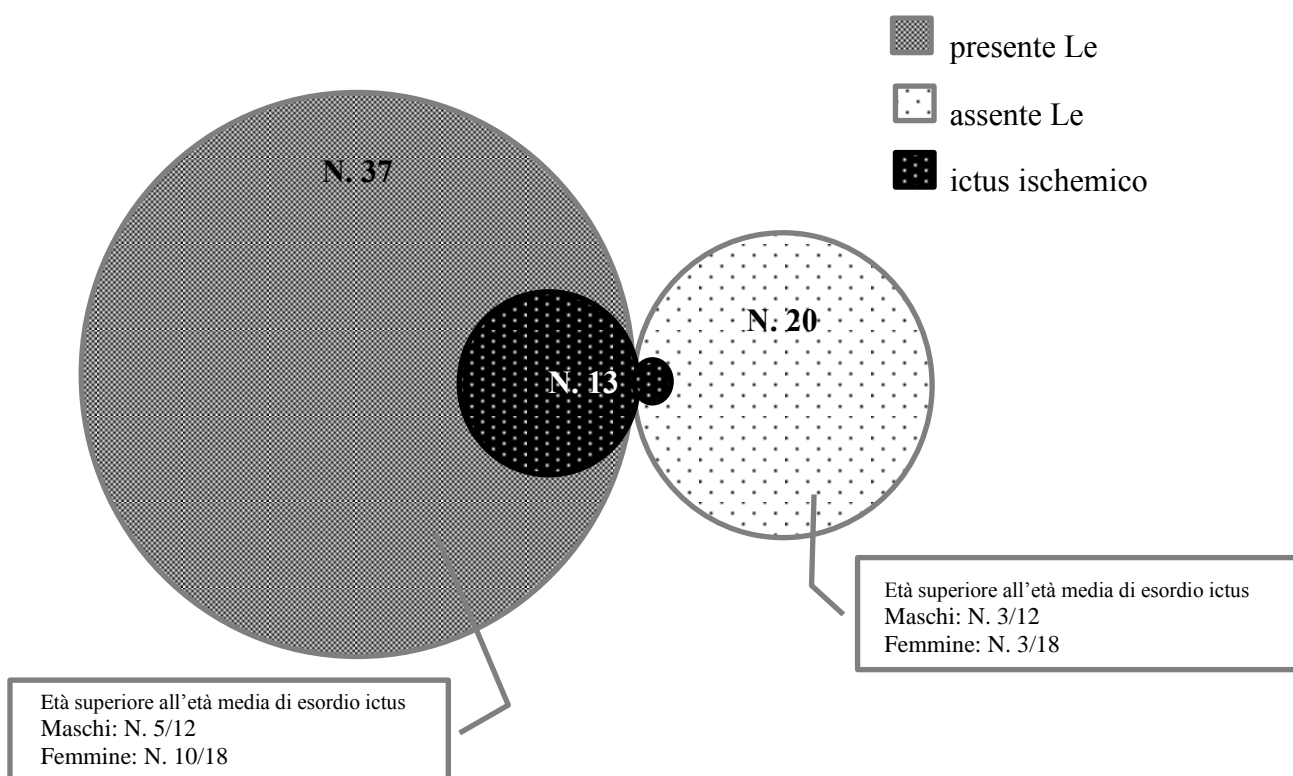
La leucoencefalopatia era presente nel 52,9% dei pazienti Fabry. Nella figura 4 è rappresentata la distribuzione della leucoencefalopatia e della sua gravità, misurata secondo la scala di Fazekas in relazione all'età (per decenni).

Figura 4. Frequenza della leucoencefalopatia e della sua gravità in relazione all'età (per decenni) nei 48 pazienti Fabry per i quali erano disponibili le immagini di RMN encefalo.



Analizzando la leucoencefalopatia in accordo alla diagnosi di ictus ischemico (tabella 7), come già visto, essa era documentata nel 92,3% dei pazienti con ictus, ma anche in una significativa proporzione dei pazienti senza ictus ischemico (65,8%) ($p=0,064$). In una paziente di 26 anni con ictus ischemico in territorio circolatorio posteriore (POCS) non era presente leucoencefalopatia (figura 5).

Figura 5. Rappresentazione schematica della relazione tra leucoencefalopatia (Le) ed ictus ischemico nei 57 pazienti Fabry



Un grado moderato/grave di leucoencefalopatia alla *Fazekas scale* era presente nel 50,0% dei pazienti con ictus e nel 13,9% dei pazienti senza ictus ($p=0,010$) (tabella 7).

I CMBs erano presenti solamente in 3 pazienti affetti da ictus ischemico (25,0% vs 0,0%; $p=0,002$) (tabella 7).

La tortuosità dell'arteria basilare era significativamente più rappresentata tra i pazienti con ictus (75,0% vs 22,0%; $p<0,001$), anche se una grave dilatazione dell'arteria con morfologia aneurismatica veniva raggiunta solamente in 3 pazienti non affetti da ictus ischemico ($p=0,302$) (tabella 7).

Tabella 7. Caratteristiche neuroradiologiche in relazione alla presenza di ictus ischemico

	Totale Fabry N. 57	Ictus N. 13 (%)	Non Ictus N. 44 (%)	p
RMN encefalo+Willis	48	12	36	
TC cranio	3	1	2	
Leucoencefalopatia (n. 51)	27 (52,9)	12 (92,3)	25 (65,8)	0,064
Fazekas scale (n. 48 RMN)				
Assente	13	1	12	
Lieve	24	5	19	0,010*
Moderata	9	4	5	
Grave	2	2	0	
CMBs (n. 48 RMN)	3 (6,25)	3 (25,0)	0 (0,0)	0,002
Tortuosità BA (n. 48 RMN)	17 (30,9)	9 (75,0)	8 (22,2)	<0,001
Grave ectasia (aneurisma fusiforme)	3	0 (0,0)	3 (8,3)	0,302

3) *Analisi dei fattori di rischio vascolare in relazione alla presenza di ictus ischemico*

I fattori di rischio vascolare più rappresentati nella nostra popolazione di pazienti Fabry erano l'ipercolesterolemia (42,1%), l'ipertensione arteriosa (40,3%) e l'iperomocisteinemia (31,6%). Erano rappresentati anche il tabagismo (22,8%), l'ipertrigliceridemia (10,5%), la fibrillazione atriale (7,0%) e l'ipertrigliceridemia (7,0%). Nessun paziente era affetto da diabete mellito.

L'ipercolesterolemia (69,2% vs 34,1%; p=0,024) e l'iperomocisteinemia (53,8% vs 25,0%; p=0,049) erano significativamente più rappresentati nei pazienti con ictus ischemico.

I dettagli circa la frequenza dei fattori di rischio vascolare in accordo alla presenza di ictus ischemico sono rappresentati in tabella 8.

Tabella 8. Fattori di rischio vascolare e ictus ischemico

	Totale Fabry N. 57	Ictus N. 13 (%)	Non Ictus N. 44 (%)	p
Ipercolesterolemia	24 (42,1)	9 (69,2)	15 (34,1)	0,024
Ipertensione	23 (40,3)	6 (46,1)	17 (38,6)	0,627
Iperomocisteinemia	18 (31,6)	7 (53,8)	11 (25,0)	0,049
Fumo	13 (22,8)	2 (15,4)	11 (25,0)	0,468
Iperuricemia	6 (10,5)	1 (7,7)	5 (11,4)	0,705
Fibrillazione atriale	4 (7,0)	1 (7,7)	3 (6,7)	0,914
Ipertrigliceridemia	4 (7,0)	0 (0,0)	4 (9,1)	0,259
Diabete Mellito	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	---

*Dicotomizzata: assente/lieve vs moderata/grave

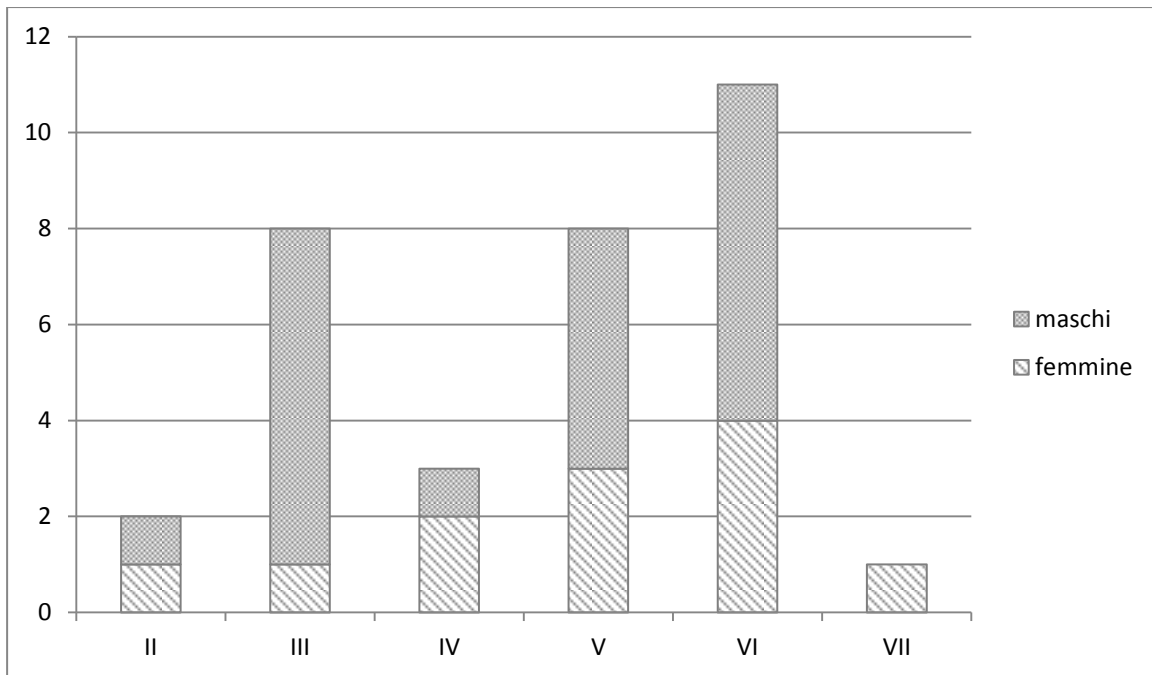
4) *Terapia enzimatica sostitutiva ed ictus ischemico cerebrale*

Sono stati sottoposti a terapia enzimatica sostitutiva (ERT) 34 (59,6%) pazienti.

I 23 (40,4%) pazienti non trattati erano costituiti da 2 maschi e 21 femmine, con un'età media all'ultimo *follow up* di 48,6±18,7 anni. I motivi per cui non sono stati trattati (al momento dell'ultimo follow up) erano: rifiuto x1 (1maschio), in fase di stadiazione x5 (1 maschio), non segni di coinvolgimento d'organo x12, età avanzata alla diagnosi x4. In un'ultima paziente è stata posta indicazione alla ERT al momento dell'ultima visita di *follow up* per la comparsa di iniziali segni di danno d'organo (neuropatia delle piccole fibre, cornea verticillata, ipoacusia).

In figura 6 è rappresentato il numero di pazienti in ERT in funzione dell'età di inizio della ERT e del sesso.

Figura 6. Età di inizio della ERT (per decenni) nei due sessi. E' stato indicato il numero di soggetti maschi/femmine che hanno iniziato la ERT nelle differenti decenni di vita.



Dei 34 pazienti in ERT, dodici pazienti (92,3%) avevano ≥ 1 ictus ischemico e 22 (50,0%) no ($p=0,006$). In una paziente, diagnosticata nell'ambito di uno screening familiare, la ERT non è stata consigliata per età avanzata (l'ictus ischemico è occorso a 91,8 anni) (tabella 9).

L'età di inizio della ERT nei pazienti con ictus ischemico era lievemente maggiore, ma il dato non risultava statisticamente significativo ($43,9 \pm 13,1$ vs $39,0 \pm 15,2$; $p=0,350$). Nessuno dei pazienti con ictus ischemico aveva iniziato la ERT prima dei 20 anni di età, e solo 3 pazienti l'avevano iniziata prima dei 40 anni di età.

La durata media della ERT nei 2 gruppi era $6,1 \pm 3,8$ vs $7,5 \pm 4,0$.

Tabella 9. Età di esordio della ERT e durata della ERT in relazione alla diagnosi di ictus ischemico.

	Totale Fabry N. 57	Ictus N. 13 (%)	Non Ictus N. 44 (%)	p
ERT	34 (59,6)	12 (92,3)	22 (50,0)	0,006
Età inizio ERT (±DS)	41,5 (±14,6)	43,9 (±13,1)	39,0 (±15,2)	0,350
ERT < 40 anni	13 (22,4)	3 (25,0)	10 (50,0)	0,163
ERT < 20 anni	2 (3,4)	0 (0,0)	2 (4,4)	0,439
Durata ERT (±DS)	7,2 (±3,9)	6,1 (±3,8)	7,5 (±4,0)	0,329
ERT prima dell'ictus	26 (81,2)	6 (50,0)	22 (100,0)	<0,001
Età inizio ERT (±DS)	40,8 (±15,2)	47,3(±14,2)	37,7 (±15,4)	0,239
Anni in ERT (±DS)	6,6 (±4,0)	3,3 (±1,6)	7,6 (± 4,0)	0,019
Antitrombotici	23 (40,3)	13 (100,0)	10 (22,7)	<0,001
Anticoagulanti	2	1	1	
Antiaggreganti	21	12	9	
ACE-inibitori/sartanici	26 (45,6)	7 (53,8)	19 (43,2)	0,458
Statine	14 (24,6)	5 (38,5)	9 (20,4)	0,171

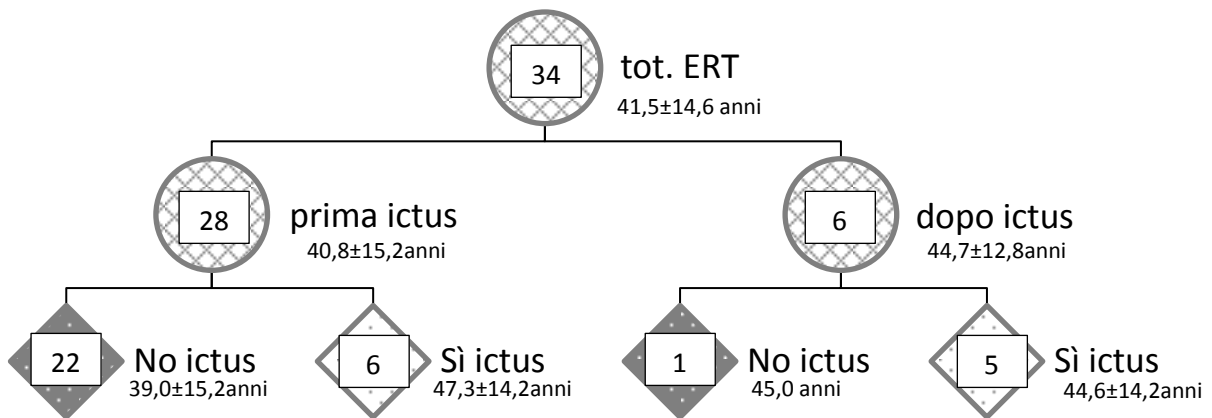
Ventisei pazienti avevano iniziato la ERT prima dell'ictus ischemico (età media 40,8±15,2); in 6 pazienti l'ictus era comunque sopraggiunto dopo l'inizio del trattamento (figura 7).

Anche in questo caso l'età media di inizio della ERT era maggiore nei pazienti con successivo ictus, ma in modo non statisticamente significativo (47,3±14,2 vs 39,0±15,2; p=0,239). La durata della ERT pre-ictus era significativamente più lunga tra i pazienti senza ictus (3,3±1,6 vs 7,5±4,0; p= 0,019) (tabella 9).

I 6 pazienti che hanno iniziato la ERT dopo l'ictus ischemico avevano un'età media all'esordio del trattamento di 44,7±12,8 anni (figura 7).

In 5 pazienti si è verificata ≥ 1 recidiva di ictus ischemico cerebrale; l'età media di inizio della ERT in questo sottogruppo era $44,6 \pm 14,2$ anni. Il paziente che non aveva presentato recidive era stato anche sottoposto a trapianto renale.

Figura 6. Terapia enzimatica sostitutiva (ERT) ed ictus ischemico cerebrale.



Le principali terapie assunte dai pazienti al momento dell'ultima visita di follow up sono riportate in tabella 9.

Discussione:

L'ictus cerebrale ha complicato il 22,8% dei pazienti Fabry seguiti presso il Centro di riferimento per la MF dell'AOUC (ovvero il 22,7% dei maschi ed il 22,8% delle femmine).

La nostra frequenza è in linea con quella pubblicata in altri studi internazionali^{147-150, 188}.

In merito alla tipologia dello stroke, tutti i pazienti della nostra casistica avevano sofferto di ictus ischemico, solamente in un caso oltre agli eventi ischemici erano state osservate due emorragie cerebrali di tipo secondario (trauma cranico ed emorragia remota durante trattamento trombolitico per l'ictus ischemico). Anche se i pazienti con MF sviluppano principalmente una patologia cerebrovascolare di tipo ischemico¹⁴⁷⁻¹⁵⁰, è noto che l'emorragia cerebrale è una possibile manifestazione della MF. Nel 2006 Buechner et al.¹⁴³ descrissero due pazienti eterozigoti per MF ultra-settantenni, diagnosticate nell'ambito di uno screening familiare ed in follow up presso il Centro di riferimento della MF dell'AOUC. Una delle due pazienti aveva sviluppato un'emorragia cerebrale a sede cerebellare in corso di terapia anticoagulante orale per la prevenzione secondaria dell'ischemia cerebrale. Pochi anni dopo Sims et al.¹⁵¹, analizzando le informazioni inerenti il coinvolgimento cerebrovascolare dei pazienti con MF inseriti nel Fabry Registry, hanno individuato, in un sottogruppo di 121 pazienti Fabry con informazioni sulla tipologia dell'ictus occorso, che l'emorragia cerebrale rappresentava il 16,9% degli ictus nei maschi (età media 47,8 anni) e il 6,8% nelle femmine (età media 57,7 anni). In un case report inerente 3 pazienti con MF ed emorragia cerebrale, Nakamura et al.¹⁴⁴ avevano descritto che l'emorragia cerebrale, nella loro esperienza, era insorta in 3 pazienti affetti da ipertensione o malattia renale in stadio avanzato, ovvero due fattori di rischio indipendenti per l'emorragia cerebrale. Da queste scarse informazioni sembra ipotizzabile che l'emorragia cerebrale sia una complicazione della MF non troppo frequente e che sia verosimilmente secondaria alla comparsa di fattori di rischio emorragico specifici, anche se le informazioni su questo fenomeno sono scarse e perlopiù aneddotiche.

Il nostro studio contribuisce principalmente a generare informazioni sugli aspetti clinico-radiologici dell'ictus ischemico in corso di MF.

L'età di esordio ($43,6 \pm 16,0$ nei maschi e $49,4 \pm 2,5$ nelle femmine) è lievemente posticipata rispetto a quanto atteso dalla letteratura¹⁵¹, ma conferma il ritardo di circa 5 anni che le femmine hanno rispetto ai maschi, forse legato ad un livello residuo maggiore di attività

dell' α -galattosidasi A (l'attività enzimatica misurata nei leucociti è nella nostra analisi tendenzialmente più bassa nei maschi e nelle femmine Fabry con ictus rispetto a quelli senza ictus). Per le restanti caratteristiche cliniche e radiologiche i due sessi si comportano sostanzialmente allo stesso modo, confermando quella parità di genere inerente le complicazioni cerebrovascolari già descritta da Fellgiebel et al.^{42,79} ma inattesa nei confronti di una malattia a trasmissione *X-linked*.

La gravità degli eventi ischemici registrati nella nostra serie clinica è risultata piuttosto contenuta, con un punteggio alla scala NIHSS medio di $3,5 \pm 1,8$; inoltre, nonostante oltre la metà dei pazienti presentasse ictus di tipo recidivante, al momento della dimissione la disabilità misurata mediante la scala mRS risultava lieve ($1,9 \pm 1,6$). Questi dati clinici, così come la distribuzione delle categorie OCSF, dove risultavano pressoché assenti le sindromi di circolo anteriore (solo una paziente con PACS), ci suggeriscono che il neurologo che si occupa di MF dovrà principalmente confrontarsi con eventi di gravità lieve-moderata e che, dall'altro lato, il neurologo che si occupa di ictus dovrà sospettare la MF soprattutto in questo *setting* di pazienti.

I dati provenienti dall'analisi del neuroimaging supportano questa ipotesi clinica. Su 47 infarti totali documentati alla RMN encefalo/TC cranio, 43 sono di tipo lacunare e 4 di tipo territoriale (3 infarti emisferici cerebellari ed 1 occipitale). Gli infarti territoriali si erano sviluppati in 3 diversi pazienti, affetti tutti da dolicoectasia dell'arteria basilare. In un caso, che aveva presentato 2 eventi territoriali recidivanti (cerebellare e occipitale) era presente una rilevante storia di cardiopalmo, anche se ripetuti esami holter cardiaci avevano fallito nel documentare la presenza di fibrillazione atriale. Anche nel lavoro di Sims et al¹⁵¹. emergeva che la gran parte degli ictus registrati nel Fabry Registry conseguiva all'occlusione di un piccolo vaso (70,4%), anche se il dato era disponibile solo in un sottogruppo di pazienti (ovvero in circa la metà degli ictus ischemici).

Nel 60% degli infarti cerebrali della nostra esperienza è presente una localizzazione in territorio circolatorio anteriore, e solo in un 40% dei casi in territorio vertebrobasilare, anche se, dopo la capsula interna, la sede di ictus più frequente nei pazienti Fabry della nostra casistica sia risultata il ponte. Questo dato, che disconferma in parte le osservazioni iniziali riportate nella prima revisione sulle complicazioni cerebrovascolari nella MF da Mitsias et al.¹³⁴ è tuttavia in accordo con altri studi, come quello longitudinale prospettico di Creutchfield et al.¹³⁵.

Alcuni dei sintomi precoci di MF, in particolare la cornea verticillata e l'ipoacusia neurosensoriale, sono risultati associati ad ictus ischemico all'analisi univariata. Questa osservazione è in linea con dati della letteratura internazionale: nel 2013 Kaminsky et al.¹⁸⁹ hanno individuato in 108 pazienti Fabry francesi un'associazione statisticamente significativa tra complicazioni cerebrovascolari (ictus, TIA, leucoencefalopatia) e cornea verticillata, disidrosi o ipoacusia, con un OR rispettivamente di 2,4, 2,9 e 7,2. L'ipoacusia veniva confermata quale predittore indipendente di interessamento cerebrovascolare anche all'analisi multivariata. La nostra analisi, seppur con un campione di minore numerosità, suggerisce, in accordo con quei dati, un ruolo specifico di cornea verticillata ed ipoacusia nella valutazione del rischio di ictus ischemico nei pazienti Fabry. Dunque questi sintomi precoci, tradizionalmente ritenuti meno rilevanti in quanto espressione di processi patologici non a rischio per la vita, potrebbero acquisire una nuova rilevanza, venendo identificati con sempre maggiore sicurezza quali marcatori di rischio per il coinvolgimento di organi maggiori, e dovrebbero essere oggetto di attento monitoraggio da parte dei medici che si occupano di MF. Un dato interessante che emerge dalla nostra analisi è invece il riscontro di una mancata associazione tra coinvolgimento renale e sua gravità ed ictus ischemico. L'insufficienza renale terminale che insorge nei maschi con fenotipo classico intorno alla III-IV decade non risulta significativamente più rappresentata nei pazienti Fabry con ictus, così come la proteinuria > 1 g/24h. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che l'ictus è una

frequente complicazione anche nei fenotipi *late onset* di malattia e nelle femmine eterozigoti, ovvero in due sottogruppi di pazienti Fabry in cui la malattia renale è assente o più lieve.

Abbastanza inattesa è anche la mancata correlazione tra ictus cerebrale ed interessamento cardiologico, in particolare con le anomalie del ritmo cardiaco. Questo dato è tuttavia in accordo con la constatazione che la gran parte degli eventi ictali da noi registrati consegue ad un'occlusione di piccolo vaso cerebrale (infarto lacunare) e non a cardioembolia. In un contesto di monitoraggio periodico cardiologico (quale quello a cui sono sottoposti i pazienti Fabry della nostra serie) la comparsa di anomalie del ritmo quali la fibrillazione atriale e l'instaurarsi delle appropriate terapie antitrombotiche di prevenzione secondaria potrebbe aver prevenuto l'insorgenza di disabilitanti ictus cardioembolici. L'unico trend di associazione osservato a livello cardiaco è stato con la cardiomiopatia ipertrofica, che forse potrebbe essere spiegato da meccanismi patogenetici a comune, essendo l'ipertrofia cardiaca legata non solamente all'accumulo primario di glicosfingolipidi nei miocardiociti, ma anche alla disfunzione microcircolatoria coronarica⁶².

L'osservazione dei reperti neuroradiologici della nostra serie ha fornito ulteriori interessanti spunti di riflessione.

La comparsa di leucoencefalopatia fin dalle prime decadi di vita, ed anche prima dello sviluppo dell'ictus ischemico cerebrali è una nozione già nota^{42, 135}.

Tuttavia queste due manifestazioni cerebrovascolari non sono sempre associate. Nella nostra serie clinica si è verificato un infarto in territorio vertebrobasilare in una paziente di 26 anni non affetta da leucoencefalopatia, e dall'altro lato abbiamo documentato una discreta proporzione (15/30) di pazienti con leucoencefalopatia che non avevano sviluppato ictus nonostante avessero superato l'età media di comparsa dello stroke in relazione al sesso.

Inoltre nella nostra esperienza il 68.6% dei pazienti presentava un grado lieve di leucoencefalopatia alla Fazekas scale, e solo il 5,8% dei pazienti presentava un grado grave ed ad un'età > 60 anni. La scarsa gravità della leucoencefalopatia e la mancanza di localizzazioni specifiche (come invece sono il polo temporale e la capsula esterna nella CADASIL) rendono questo reperto piuttosto aspecifico e non suggestivo di MF durante la fase di diagnosi della malattia. Di fatto nel già citato studio di Fellgiebel et al¹⁵⁹. la leucoencefalopatia non risultava una variabile predittiva della MF nella popolazione di pazienti con ictus giovanile. Resta inoltre da indagare il suo ruolo quale predittore di ictus in corso di MF, essendo presente, particolarmente nel sesso femminile, ovvero in una categoria di soggetti con indicazioni alla ERT meno definite, una significativa proporzione di soggetti che giunge alle età più avanzate in assenza di ictus. Sarebbero pertanto necessari studi con disegno longitudinale volti ad indagare meglio questo fenomeno.

La frequenza dei CMBs all'interno del campione esaminato (6,2 %) è risultata piuttosto contenuta. In una recente revisione, Charidimou et al¹⁹⁰. analizzavano i dati di prevalenza dei CMBs in varie categorie di pazienti. La prevalenza dei CMBs nella popolazione generale sembrava essere inferiore al 5%, mentre i tassi di prevalenza più elevati venivano riscontrati in pazienti con primo ictus ischemico (> 20%), con primo ictus emorragico (> 50%), in caso di ictus ischemico ricorrente (> 40%) o emorragia cerebrale ricorrente (> 80%). In merito alla localizzazione lobare o sottocorticale/infratentoriale, nel Rotterdam scan study¹⁹¹ i CMBs lobari risultavano associati al genotipo APO E ε4 (genotipo caratteristico dell'angiopatia amiloide cerebrale), mentre i CMBs a sede profonda ed infratentoriale erano invece associati all'ipertensione sistolica, alla presenza di infarti lacunari e di leucoencefalopatia, e configurandosi quindi quali potenziali marcatori radiologici della microangiopatia cerebrale età correlata/ipertensiva. Nella CADASIL la prevalenza dei CMBs è stata stimata in una percentuale compresa tra 31%¹⁹² e 69%¹⁹³, e correlata con l'età e la sintomaticità dei pazienti.

Per quanto riguarda la MF esiste un unico studio di prevalenza, pubblicato da Reisin et al¹⁴⁵. nel 2011. In questo studio erano sottoposti a RMN encefalo pazienti affetti da MF e negativi per ictus e per malattia renale avanzata: 3/26 (11%) donne indagate con sequenze GRE-pesate presentavano almeno 1 CMB. Si trattava comunque di pazienti affette da fattori di rischio vascolare aggiuntivi (ipertensione ed età avanzata) e leucoencefalopatia. Il nostro studio, includente anche pazienti con ictus, avrebbe potuto documentare frequenze superiori, tuttavia, nella nostra esperienza i CMBs erano presenti solamente nella sotto-popolazione con ictus ischemico cerebrale, con una frequenza in linea a quanto atteso per questa categoria di pazienti.

Un altro spunto di riflessione interessante nasce dall'associazione tra dolico basilare ed ictus ischemico all'interno dei pazienti con MF. E' già noto che la dolico basilare è un carattere utile ad identificare i pazienti con MF sia rispetto alla popolazione sana che rispetto ai soggetti con ictus cerebrale¹⁵⁹⁻¹⁶⁰. I nostri dati sembrano suggerire un suo ruolo nell'identificare all'interno dei pazienti con MF quelli affetti da ictus cerebrale. Abbastanza interessante, anche se del tutto preliminare, è l'osservazione che è soprattutto la tortuosità dell'arteria basilare ad essere associata ad ictus, e non il diametro del vaso. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che un decorso particolarmente tortuoso, obbligando le arterie perforanti ad angolazioni patologiche nel momento di ingresso nel parenchima, potrebbe predisporre particolarmente all'infarto lacunare a livello del tronco encefalico.

I fattori di rischio vascolare più rappresentati nella nostra casistica sono stati l'ipercolesterolemia, l'ipertensione arteriosa, l'iperomocisteinemia ed il tabagismo. I primi 3 fattori erano maggiormente rappresentati nei pazienti con ictus ischemico. La strategia di prevenzione dell'ictus ischemico in corso di MF non deve fondarsi esclusivamente sulla iniziazione del trattamento specifico con ERT. E' importante, come suggerito da questa analisi, impostare nella MF un protocollo attento di gestione del rischio vascolare, includente

le specifiche misure di controllo dei fattori di rischio, sia in ambito di prevenzione primaria che secondaria.

Un'ultima considerazione concerne l'efficacia della ERT nella prevenzione dell'ictus ischemico in corso di MF.

Le due formulazioni di agalsidasi (alfa o beta) sono incapaci di attraversare la barriera emato-encefalica, e possono dunque agire, all'interno del SNC, esclusivamente a livello delle cellule endoteliali¹⁹⁴. Tuttavia l'accumulo di sfingolipidi si sviluppa non solo nella cellula endoteliale, ma anche nel contesto della cellula muscolare liscia della parete arteriosa. In una interessante revisione sulla vasculopatia Fabry, Rombach et al.¹⁹⁵ individuano nella proliferazione delle cellule muscolari lisce (conseguente all'accumulo di Gb3) la causa dell'incremento dello spessore intima-media delle arterie, ma anche della produzione di radicali liberi dell'ossigeno e dell'aumento dei livelli di ossido nitrico inducibile. Questi processi biochimici comportano uno stato di attivazione pro-trombotica della cellula endoteliale, che può essere potenziato dalla copresenza di fattori di rischio vascolare. Inoltre l'accumulo di lunga durata dei glicosfingolipidi induce l'attivazione di processi fibrotici sia di rimaneggiamento della parete vascolare che del tessuto cerebrale ischemico che divengono irreversibili¹⁹⁶.

La ERT è stata autorizzata in Italia a partire dall'anno 2001. La gran parte dei pazienti con MF della nostra esperienza (62,5%) ha iniziato il trattamento enzimatico a partire dalla V decade di vita, la decade di comparsa dell'ictus ischemico in entrambi i sessi. E' verosimile che al momento di inizio della ERT una significativa proporzione di pazienti presentasse già una significativa vasculopatia cerebrale, e si fossero già instaurati quei processi fibrotici secondari di cui sopra. Di fatto 6/32 pazienti avevano già sviluppato ictus ischemico cerebrale, ed ulteriori 6 pazienti, con un'età media all'inizio della ERT di 47,3±14,2 anni, hanno presentato un primo ictus dopo essere stati posti in trattamento.

Questi dati preliminari sembrerebbero suggerire la necessità di intraprendere la ERT prima della comparsa dell'ictus ischemico cerebrale, pur essendo comunque incerta la sua capacità di prevenzione dell'ictus ischemico (dato l'accumulo primitivo di glicosfingolipidi nelle cellule muscolari lisce, dove il farmaco non penetra).

Gli studi inerenti l'efficacia della ERT nella prevenzione delle complicanze cerebrovascolari sono scarsi e prevalentemente basati su markers surrogati: esistono prove circa l'efficacia di agalsidasi alfa nella correzione di un flusso ematico cerebrale abnorme¹⁹⁷ e le anomalie nella risposta autoregolatoria cerebrovascolare¹⁹⁸; esistono inoltre prove in parte conflittuali sull'efficacia di agalsidase beta¹⁹⁹ e alfa²⁰⁰ nei confronti della progressione della leucoencefalopatia, tuttavia, come nella nostra esperienza, ictus ischemici cerebrali sono occorsi durante il trattamento con entrambe le formulazioni²⁰¹⁻²⁰².

Si rende necessario lo sviluppo di nuove molecole farmacologiche in grado di interferire a monte con la produzione di sfingolipidi, o di oltrepassare la barriera emato-encefalica per rimuovere più efficacemente l'accumulo glicosfingolipidico dal SNC.

A tale proposito, nell'ultima sezione di questa tesi, sarà brevemente descritta la partecipazione della candidata ad uno studio clinico di fase 3 inerente l'impiego degli chaperon nella MF. L'interesse nei confronti di questo protocollo sperimentale era nato principalmente dalla capacità degli chaperon di oltrepassare la barriera emato-encefalica.

Conclusioni:

L'ictus cerebrale è una frequente complicazione in corso di MF, interessando oltre il 20% dei pazienti, con uguale frequenza e caratteristiche nei due sessi.

La grande maggioranza degli ictus in corso di MF è di tipo ischemico. Da un punto di vista clinico, pur essendo possibile un esordio fin dalla II decade di vita, mediamente questa

complicanza si sviluppa in entrambi i sessi all'interno della V decade, con un esordio anticipato nei maschi di circa 5 anni. Tipicamente occorrono eventi di lieve gravità e disabilità, ma con natura recidivante. Nella nostra esperienza prevalgono da un punto di vista radiologico gli infarti di tipo lacunare su quelli territoriali; il 60% degli infarti si sviluppa in territorio circolatorio anteriore.

Alcuni sintomi precoci, quali la cornea verticillata e l'ipoacusia neurosensoriale, ed alcune caratteristiche di neuroimaging, quale la dolico basilare, devono essere attentamente ricercati e monitorati nei pazienti con MF, in quanto associati a ictus ischemico cerebrale. Studi con disegno longitudinale e prospettico potrebbero confermare il loro ruolo quali marcatori di rischio di ictus ischemico all'interno dei pazienti con MF.

I fattori di rischio vascolare tradizionali devono essere attentamente ricercati e corretti nei pazienti con MF, particolarmente ipercolesterolemia, iperomocisteinemia ed ipertensione arteriosa.

L'emorragia cerebrale è una complicazione possibile ma non frequente in corso di MF e sembra associata alla comparsa di fattori di rischio emorragico legati anche direttamente all'evoluzione della malattia da accumulo o alle terapie sintomatiche utilizzate come coadiuvanti del suo trattamento. La presenza di CMBs nelle immagini di neuroimaging potrebbe permettere di individuare un sottogruppo di pazienti Fabry a rischio di complicazioni emorragiche, ma anche in questo contesto mancano studi con disegno longitudinale.

I dati che abbiamo raccolto preliminarmente circa la terapia enzimatica sostitutiva della MF sembrano non supportare una sua efficacia nella prevenzione dell'ictus ischemico cerebrale. Tuttavia nella maggior parte dei nostri pazienti la ERT è stata iniziata dopo la comparsa dell'ictus ischemico o in presenza di età avanzata (V decade), quando ormai a livello del distretto circolatorio cerebrale sono attese alterazioni anatomopatologiche anche irreversibili.

Partecipazione allo studio clinico multicentrico internazionale (ongoing):

“A randomized, open-label study to compare the efficacy and safety of AT1001 and Enzyme Replacement Therapy (ERT) in patients with Fabry disease and AT1001-responsive GLA mutations who were previously treated with ERT”

La candidata ha partecipato in qualità di Sub-Investigatore allo studio clinico multicentrico internazionale AT1001-012, uno studio volto a confrontare l'efficacia e la sicurezza di AT1001 rispetto alla ERT in pazienti affetti da MF e portatori di mutazioni del gene GLA responsive nei confronti di AT1001.

Il trial è sponsorizzato da AMICUS Therapeutics, ed il Principal Investigator del trial per il Centro di riferimento della Malattia di Fabry dell'AOUC di Firenze è il dr. I. Olivetto, cardiologo. L'altro Sub-Investigatore dello studio è la dr.ssa B. Tomberli, dottoranda presso l'Università degli studi di Firenze.

Le informazioni inerenti lo studio, tuttora *ongoing*, di seguito riportate sono consultabili sul sito: <http://clinicaltrials.gov>.

Tradizionalmente si riteneva che la MF conseguisse, al pari di altre malattie lisosomiali, ad una mutazione del gene GLA responsabile di una completa assenza dell'enzima α GAL A. Tuttavia abbiamo visto fin dall'introduzione di questa tesi che la MF può svilupparsi anche in presenza di un'attività enzimatica residua, seppur ridotta (fenotipo atipico o *late onset*). Questa condizione si verifica quando la mutazione comporta alterazioni minori della struttura della proteina, inducendo un danno nella sua conformazione tridimensionale (proteina *misfolded*) che non coinvolge tuttavia il sito attivo dell'enzima. I sistemi di controllo del prodotto proteico presenti all'interno della cellula riconoscono le proteine *misfolded* e si

occupano della loro precoce degradazione, impedendo all'enzima il raggiungimento del sito di azione a livello del lisosoma cellulare. Gli chaperon sono piccole molecole farmacologiche capaci di riconoscere l'enzima *misfolded* (ad es. legandosi in modo competitivo col substrato al suo sito attivo) e di stabilizzarne la struttura, consentendo alla proteina il raggiungimento del lisosoma. A livello lisosomiale lo chaperon viene sostituito dal substrato, presente ad alte concentrazioni, e l'enzima può normalmente esplicare la propria attività. Il limite più importante di questa terapia risiede nel fatto che la sua azione viene esplicata esclusivamente nei confronti di mutazioni con attività enzimatica residua (enzima *misfolded*), quindi con fenotipo clinico più lieve.

Il termine AT1001 descrive il farmaco Migalastat idrocloride o DGJ, uno zucchero con azione di chaperon nei confronti dell'enzima α GAL A. Il farmaco ha due importanti proprietà: 1) è capace di attraversare la barriera emato-encefalica e 2) ha una somministrazione orale (a giorni alterni). In un trial²⁰³ con 27 pazienti, trattati fino a 2 anni con Migalastat, il farmaco è risultato sicuro e ben tollerato, dimostrando di incrementare l'attività dell'enzima α -galattosidasi A su leucociti, rene e cute, e ridurre i livelli di Gb3 nelle urine e nelle biopsie di rene di 24 pazienti. E' possibile predire in vitro la presenza di risposta della mutazione del gene GLA allo chaperon.

Lo studio AT1001-012 prevede un confronto in aperto, dopo iniziale randomizzazione, tra AT1001 e un comparatore attivo, ovvero agalsidase alfa o beta (in continuità con la formulazione di farmaco per la ERT precedentemente assunta dal paziente) in pazienti già trattati con ERT.

La misura di outcome primaria dello studio è la funzionalità renale, misurata tramite il GFR dello iohexolo.

Misure di outcome secondarie sono: la funzionalità renale misurata tramite il GFR e la proteinuria delle 24 ore, un outcome clinico composito comprendente nuovi eventi renali

cardiaci e cerebrovascolari, la funzionalità cardiaca misurata tramite misure ecocardiografiche, e report del paziente mediante questionario strutturato inerenti dolore e qualità di vita.

I Criteri di inclusione principali sono:

- Pazienti di entrambi i sessi con età compresa tra 16-74 anni
- Mutazione del gene GLA che ha dimostrato di essere sensibile a AT1001 in vitro
- Somministrazione continuativa della ERT per un periodo di almeno 12 mesi (ad un dosaggio stabile da almeno 3 mesi)
- $GFR \geq 30\text{ml/min/1.73mq}$

I Criteri di esclusione principali sono:

- Grave patologia renale (paziente in dialisi, in lista di attesa per il trapianto o trapiantato)
- TIA/ictus ischemico o Angina/IMA nei 3 mesi precedenti lo studio
- Malattia cardiaca instabile
- Gravidanza o allattamento
- Allergia al farmaco di studio o allo ioexolo

Lo studio, iniziato a Dicembre 2010, ha previsto l'arruolamento di 50 pazienti con MF in differenti nazioni. La prima fase dello studio, di confronto in aperto dei due farmaci, ha una durata di 18 mesi e la sua chiusura è programmata ad Agosto 2014. E' tuttavia possibile per i pazienti partecipare alla fase di estensione dello studio, in cui sarà possibile shiftare all'assunzione di AT1001, per un periodo di ulteriori 9 mesi.

La candidata ha partecipato (in collaborazione con il principal investigator e l'altro sub-investigator) alle procedure di selezione dei pazienti con MF ed alle visite di monitoraggio schedate dal protocollo di studio. Sono state arruolate presso il Centro di Firenze due pazienti, portatrici della mutazione p.Arg301Pro, che sono state randomizzate entrambe all'assunzione del farmaco AT1001. Entrambe le pazienti hanno completato il periodo iniziale di 18 mesi ed optato per la partecipazione ai 9 mesi del periodo di estensione.

Riferimenti bibliografici:

1. Ferro JM, Massaro AR, Mas JL. Aetiological diagnosis of ischemic stroke in young adults. *Lancet Neurol* 2010; 9: 1085-1096
2. Nencini P, Inzitari D, Baruffi MC, et al. Incidence of stroke in young adults in Florence, Italy. *Stroke* 1988;19:977-981
3. Radhakrishnan k, Ashok PP, Sridharan R,et al. Mousa ME, Stroke in the young: incidence and pattern in Benghazi, Lybia. *Acta Neurol Scand.* 1986; 73: 434-438.
4. Marini C, Totaro R, De Santis F, et al. Stroke in young adults in the Community-based l'Aquila Registry. Incidence and prognosis. *Stroke* 2001; 32:52-56
5. Putaala J, Metso AJ, Metso TM, et al. Analysis of 1008 consecutive patients aged 15 to 49 with first-ever ischemic stroke: the Helsinki young stroke registry. *Stroke* 2009; 40: 1195-1203
6. von Sarnowski B, Putaala J, Grittner U,et al. for the sifap1 Investigators. Lifestyle risk factors for ischemic stroke and transient ischemic attack in young adults in the Stroke in Young Fabry Patients study. *Stroke.* 2013 Jan;44(1):119-25
7. Rolfs A, Fazekas F, Grittner U, et al. for Stroke in Young Fabry Patients (sifap) Investigators. Acute cerebrovascular disease in the young: the Stroke in Young Fabry Patients study. *Stroke.* 2013 Feb;44(2):340-9.
8. Schurks M, Rist PM, Bigal ME,et al.. Migraine and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2009; 339:b3914
9. Chakhtoura Z, Canonico M, Gompel A, et al. Progesteron-only contraceptives and the risk of stroke: a meta-analysis. *Stroke* 2009; 40: 1059-1062
10. Baptista MV, Ferreira S, Pinho-E-Melo T,et al. PORTuguese Young STROKE Investigators. Mutations of the GLA gene in young patients with stroke: the PORTYSTROKE study—screening genetic conditions in Portuguese young stroke patients. *Stroke.* 2010;41:431–436
11. Leys D, Bandu L, Hénon H, et al. Clinical outcome in 287 consecutive young adults (15 to 45 years) with ischemic stroke. *Neurology.* 2002 Jul 9;59(1):26-33.
12. Cerrato P, Grasso M, Imperiale D,et al. Stroke in young patients: etiopathogenesis and risk factors in different age classes. *Cerebrovasc Dis.* 2004;18(2):154-9. Epub 2004 Jul 13.
13. Musolino R, La Spina P, Granata A, et al. Ischaemic stroke in young people: a prospective and long-term follow-up study. *Cerebrovasc Dis.* 2003;15(1-2):121-8.

14. Varona JF, Bermejo F, Guerra JM, et al. Long-term prognosis of ischemic stroke in young adults. Study of 272 cases. *J Neurol*. 2004 Dec;251(12):1507-14.
15. Putaala J, Kurkinen M, Tarvos V, et al. Silent brain infarcts and leukoaraiosis in young adults with first-ever ischemic stroke. *Neurology*. 2009 May 26;72(21):1823-9.
16. Yesilot Barlas N, Putaala J, Waje-Andreassen U, et al. Etiology of first-ever ischaemic stroke in European young adults: the 15 cities young stroke study. *Eur J Neurol*. 2013 Nov;20(11):1431-9
17. Asheikh-Ali AA, Thaler De, Kent DM. Patent foramen ovale in cryptogenic stroke: incidental or pathogenic? *Stroke* 2009; 40: 2349-2355)
18. Di Tullio MR, Sacco RL, Sciacca RR, et al. Patent foramen ovale and the risk of ischemic stroke in a multiethnic population. *J AM Coll Cardiol* 2007; 49: 797-802
19. Almekhlafi MA, Wilton SB, Rabi DM, et al. Recurrent cerebral ischemia in medically treated patent foramen ovale: a meta-analysis. *Neurology* 2009; 73: 89-97
20. Touze E, Gauvrit JY, Moulin T, et al. Risk of stroke and recurrent dissection after a cervical artery dissection: a multicenter study. *Neurology* 2003; 61: 1327-1351
21. Dichgans M. Genetics of ischemic stroke. *Lancet Neurol* 2007; 6: 149-161
22. Ballabio E, Bersano A, Bresolin N, et al. Monogenic vessel diseases related to ischemic stroke: a clinical approach. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27:1649-62
23. Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol* 2006; 5: 501-502
24. Razvi SS, Davidson R, Bone I, et al. The prevalence of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) in the west of Scotland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:739-741
25. Federico A, Di Donato I, Bianchi S, et al. Hereditary cerebral small vessels diseases: a review. *J Neurol Sciences* 2012; 322-. 25-30
26. O'Sullivan M, Jarosz JM, Martin RJ, et al. MRI hyperintensities of the temporal lobe and external capsule in patients with CADASIL. *Neurology* 2001; 56: 628-634
27. Ruchoux MM, Chabriat H, Bousser MG, et al. Presence of ultrastructural arterial lesions in muscle and skin vessels of patients with CADASIL. *Stroke* 1994; 25: 2291-2292
28. Testai FD, Gorelick PB, Inherited metabolic disorders and stroke part 2: homocystinuria, organic acidurias, and urea cycle disorders. *Arch Neurol* 2010; 67: 148-153

29. Lentz SR Mechanism of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Throm Haemost* 2005;3(8):1646-1654
30. Abahji TN, Nill L, Ide N, Keller C, et al. Acute homocysteinemia induces microvascular and macrovascular endothelial dysfunction *Arch Med Res* 2007; 38(4): 411-416
31. Kelli PJ, Furie KL, Kister JP et al. Stroke in young patients with hyperhomocysteinemia due to cystathionine β -synthase deficiency. *Neurology* 2003; 60: 275-279.
32. Chauveheid MP, Lidove O, Papo T, et al. Adult-onset homocystinuria arteriopathy mimics fibromuscular dysplasia. *Am J Med* 2008; 121:e5-e6
33. Testai FD, Gorelick PB, Inherited metabolic disorders and stroke part 1: Fabry disease and Mitochondrial myopathy, Encefalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes . *Arch Neurol* 2010; 67: 19-24
34. Yoneda M, Maeda M, Kimura H, Fujii A, et al. Vasogenic edema on MELAS: a serial study with diffusion-weighted MR imaging. *Neurology* 1999; 53: 2182-2184
35. Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2010; 5:30
36. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In the *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. Edited by: Scriver CR et al. New York: McGrawHill; 2001: 3733-3774.
37. Neufeld EF. Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem* 1991; 60:257-280
38. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Gent* 1999; 105: 151-156
39. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999; 281:249-254
40. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M et al. High incidence of late-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Med Genet* 2006; 79:31-40
41. Hwu WL, Chien YH, Lee NC et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat* 2009, 30: 1397-1405
42. Buechner S, Moretti M, Burlina AP et al. Central Nervous system involvement in Fabry disease: a clinical and MRI retrospective study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 1249-1254
43. Charrow J. A 14-year-old boy with pain in hands and feet. *Pediatr Ann* 2009;38:190-192

44. Miners AH, Holmes A, Sherr L et al. Assessment of health-related quality-of- life in males with Anderson Fabry disease before therapeutic intervention. *Qual Life Res* 2002; 11:127-133
45. Cole AL, Lee PJ, Hughes DA et al. Depression in adults with Fabry disease: a common and undiagnosed problem. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:943-951
46. Orteu CH, Jansen T, Lidove O et al. Fabry disease and the skin: data from FOS, the Fabry Outcome Survey. *Br J Dermatol* 2007; 157:331-337
47. Fervenza FC, Torra R, Lager DJ. Fabry disease: an unrecognized cause of proteinuria. *Kidney Int* 2008; 73:1193-1199
48. Froissart M, Benistan K, German DP. Functional renal investigation in Fabry disease. *Presse Med* 2007; 36:S36-42
49. Schiffmann R, Warnock DG, Banikazemi M et al. Fabry disease: progression of nephropathy and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:2102-2111
50. Linhart A, Palecek T, Bultas J et al. New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease. *Am Heart J* 2000; 139:1101-1108
51. Kampmann C, Baehner F, Whybra C et al. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in heterozygous females. *J Am Coll Cardiol* 2002, 40:1668-1674
52. Shah JS, Hughes DA, Sachdev B et al. Prevalence and clinical significance of cardiac arrhythmia in Anderson-Fabry disease. *Am J Cardiol* 2005; 96:842-846
53. Sheth KJ, Thomas JP Jr. Electrocardiograms in Fabry's disease. *J Electrocardiol* 1982; 15:153-156
54. Yokoyama A, Yamazoe M, Shibata A. A case of heterozygous Fabry's disease with a short PR interval and giant negative T waves. *Br Heart J*. 1987; 57:296-299
55. Wise D. Short PR intervals and tachyarrhythmias in Fabry disease. *Postgrad Med J*. 1986; 62:969
56. Linhart A, Kampmann C, Zamorano JL et al. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease: results from the international Fabry Outcome Survey. *Eur Heart J* 2007; 28:1228-1235
57. Kampmann C, Linhart A, Baehner F et al. Onset and Progression of the Anderson-Fabry disease related cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2008; 130:367-373
58. Takenaka T, Teraguchi H, Yoshida A et al. Terminal stage cardiac findings in patients with cardiac Fabry disease: an electrocardiographic, echocardiographic, and autopsy study. *J Cardiol* 2008; 51:50-59

59. Linhart A, Elliot PM. The heart in Fabry disease and others lysosomal storage disorders. *Heart* 2007; 93:528-535
60. Niemann M, Breunig F, Beer M et al. The right ventricle in Fabry disease: natural history and impact of enzyme replacement therapy. *Hearth* 2010
61. Elliot PM, Kindler H, Shah JS et al. Coronary microvascular dysfunction in males patients with Anderson-Fabry disease and the effect of treatment with alpha galactosidase A. *Hearth* 2006; 92: 357-360
62. Tomberli B, Cecchi F, et al. Coronary microvascular dysfunction is an early feature of cardiac involvement in patients with Anderson–Fabry disease. *Eur J Heart Fail* (2013) 15 (12): 1363-1373
63. Goldman ME, Cantor R, Schwartz MF et al. Echocardiographic abnormalities and disease severity in Fabry’s disease. *J A Coll Cardiol* 1986; 7:1157-1161
64. Weidemann F, Stromann JM, Niemann M et al. Heart valve involvement in Fabry cardiomyopathy. *Ultrasound Med Biol* 2008; 35:730-735
65. Magage S, Lubanda JC, Germain DP et al. Respiratory involvement in patients with Fabry disease. *Med Sci (Paris)* 2005; 21: 37-39
66. Germain DP. Bone and muscle involvement in Fabry disease. In *Fabry disease*. Edited by: Elstein D, Altarescu G, Beck M Dordrecht, Heidelberg, London, New-York: Springer; 2010; 33:429-436
67. Falke K, Buttner A, Schittkowski M et al. The microstructure of cornea verticillata in Fabry disease and amiodrone-induced keratopathy: a cofocal laser-scanning microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophtalmol* 2009; 247: 523-534
68. Sher NA, Letson RD, Desnick RJ: the ocular manifestation of Fabry disease. *Arch Ophthalmol* 1979;97:671-676
69. Ishii S, Kase R, Sakuraba H et al. Characterization of a mutant alphasgalactosidase gene product for the late-onset cardiac form of Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 1585-1589
70. Ishii S, Chang HH, Kawasaki K et al. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: *biochem J* 2007; 406: 285-295
71. Elleder M, Bradova V, Smid F et al. Cardyocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry’s disease. *Virchows ArchPathol Anat Histopathol* 1990; 417:449-455
72. Nakao S, Takaneda T, Maeda M et al. An atypical variant of Fabry’s disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Eng J Med* 1995; 333:288-293

73. Nakao S, Kodama C, Takenada T et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a “renal” variant phenotype. *Kidney Int* 2003; 64: 801-807
74. Germain DP. A new phenotype of Fabry disease with intermediate severity between the classical form and the cardiac variant, *Contrib Nephrol* 2001; 136:234-240
75. Germain DP. General aspects of X-linked diseases. In *Fabry disease. Perspectives from 5 years of FOS*. Edited by Metha AB, Beck M, Sunder-Plassman G. Oxford: Oxford Pharmagenesis 2006; 63-68
76. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*mus musculus* L.) *Nature* 1961; 190:372-373
77. Whybra C, Kampmann C, Willers I et al. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in females heterozygotes. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24: 715-724
78. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, et al. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab*. 2008; 93:112-128
79. Fellgiebel A, Müller MJ, Mazanek M, et al. White matter lesion severity in male e female patients with Fabry disease. *Neurology* 2005; 65: 600-602
80. Sakuraba H, Oshima A, Fukuhara Y, et al. Identification of point mutations in the alphasgalactosidase A gene in classical and atypical hemizygotes with Fabry disease. *Am J Hum Genet* 1990; 47:784-789.
81. Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, et al. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet* 1993; 53:1186-1197.
82. Eng CM, Desnick RJ: Molecular basis of Fabry disease: mutations and polymorphisms in the human alpha-galactosidase A gene. *Hum Mutat* 1994; 3:103-111.
83. Davies JP, Eng CM, Hill JA, Malcolm et al. Fabry disease: fourteen alpha-galactosidase A mutations in unrelated families from the United Kingdom and other European countries. *Eur J Hum Genet* 1996; 4:219-224.
84. Germain DP, Biasotto M, Tosi et al. Fluorescence assisted mismatch analysis (FAMA) for exhaustive screening of the alpha-galactosidase A gene and detection of carriers in Fabry disease. *Hum Genet* 1996; 98:719-726.
85. Eng CM, Ashley GA, Burgert TS, et al. Fabry disease: thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. *Mol Med* 1997; 3:174-182.

86. Topaloglu AK, Ashley GA, Tong B, et al. Twenty novel mutations in the alpha-galactosidase A gene causing Fabry disease. *Mol Med* 1999; 5:806-811.
87. Ashton-Prolla P, Tong B, Shabbeer J, et al. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *J Investig Med* 2000; 48:227-235.
88. Altarescu GM, Goldfarb LG, Park KY et al. Identification of fifteen novel mutations and genotype-phenotype relationship in Fabry disease. *Clin Genet* 2001; 60:46-51.
89. Ashley GA, Shabbeer J, Yasuda M, et al. Fabry disease: twenty novel alpha-galactosidase A mutations causing the classical phenotype. *J Hum Genet* 2001; 46:192-196.
90. Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol* 2004; 337:319-335.
91. Shabbeer J, Robinson M, Desnick RJ. Detection of alpha-galactosidase A mutations causing Fabry disease by denaturing high performance liquid chromatography. *Hum Mutat* 2005; 25:299-305.
92. Schaefer E, Mehta A, Gal A. Genotype and phenotype in Fabry disease: analysis of the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr Suppl* 2005; 94:87-92.
93. Shabbeer J, Yasuda M, Benson SD, et al. Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and threedimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Hum Genomics* 2006; 2:297-309.
94. Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, et al. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alphasgalactosidase gene. *J Clin Invest* 1989; 83:1390-1399.
95. Kornreich R, Bishop DF, Desnick RJ. α -Galactosidase A gene rearrangement causing Fabry disease. Identification of short direct repeats at breakpoints in an Alu-rich gene. *J Biol Chem* 1990; 265:9319-9326.
96. The human genome mutation database. 2013. <http://www.hgmd.org>..1-6-2013.
97. Froissart R, Guffon N, Vanier MT, et al. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 307-314
98. Guce AI, Garman SC. The structure of human alpha-galactosidase A and implication for Fabry disease. In *Fabry disease*. Edited by: Elstein D, Altarescu G, Beck M Dordrecht, Heidelberg, London, New-York: Springer; 2010; 21-38

99. Guce AI, Clark NE, Salgado EN et al. Catalytic mechanism of human alpha-galactosidase. *J Biol Chem* 2010; 285:3625-3623
100. Linthorst GE, De Rie MA, Tjiam KH, et al. Misdiagnosis of Fabry disease: importance of biochemical confirmation of clinical or pathological suspicion. *Br J Dermatol* 2004; 150:575-577.
101. Hoffmann B, Georg Koch H, Schweitzer-Krantz S, et al. Deficient alpha-galactosidase A activity in plasma but no Fabry disease— a pitfall in diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 2005, 43:1276-1277.
102. Linthorst GE, Poorthuis BJ, Hollak CE. Enzyme activity for determination of presence of Fabry disease in women results in 40% of false-negative results. *J Am Coll Cardiol*. 2008. 51: 2082
103. Schirinzi A, Centra M, Prattichizzo C, et al. Identification of GLA gene deletions in Fabry patients by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Mol Genet Metab* 2008, 94:382-385.
104. Auray-Blais C, Cyr D, Mills K, et al. Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:106.
105. Young E, Mills K, Morris P, Vellodi A, et al. Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatr Suppl* 2005; 94:51-54.
106. Desnick RJ, Brady R, Barranger J, et al. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med* 2003; 138:338-346.
107. Beck M: Agalsidase alfa - a preparation for enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11:851-858.
108. Desnick RJ: Enzyme replacement therapy for Fabry disease: lessons from two alphagalactosidase A orphan products and one FDA approval. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4:1167-1176.
109. Beck M: Agalsidase alfa for the treatment of Fabry disease: new data on clinical efficacy and safety. *Expert Opin Biol Ther* 2009, 9:255-261.
110. Morel CF, Clarke JT: The use of agalsidase alfa enzyme replacement therapy in the treatment of Fabry disease. *Expert Opin Biol Ther* 2009, 9:631-639.

111. Germain DP, Waldek S, Banikazemi M, et al. Sustained, long-term renal stabilization after 54 months of agalsidase beta therapy in patients with Fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1547-1557.
112. Sakuraba H, Murata-Ohsawa M, Kawashima I, et al. Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice. *J Hum Genet* 2006; 51:180-188.
113. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, et al. Safety and efficacy of recombinant human α -galactosidase A - replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 2001; 345:9-16.
114. Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA, et al. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001, 285:2743-2749.
115. Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, et al. Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146:77-86.
116. Schiffmann R, Askari H, Timmons M, et al. Weekly enzyme replacement therapy may slow decline of renal function in patients with Fabry disease who are on long-term biweekly dosing. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1576-1583.
117. Hoffmann B, Garcia de Lorenzo A, Mehta A, et al. Effects of enzyme replacement therapy on pain and health related quality of life in patients with Fabry disease: data from FOS (Fabry Outcome Survey). *J Med Genet* 2005; 42:247-252.
118. Schwarting A, Dehout F, Feriozzi S, et al. Enzyme replacement therapy and renal function in 201 patients with Fabry disease. *Clin Nephrol* 2006, 66:77-84.
119. Mehta A, Beck M, Elliott P, et al. Enzyme replacement therapy with agalsidase alfa in patients with Fabry's disease: an analysis of registry data. *Lancet* 2009; 374:1886-1896.
120. Vedder AC, Linthorst GE, Houge G, et al. Treatment of Fabry disease: outcome of a comparative trial with agalsidase alfa or beta at a dose of 0.2 mg/kg. *PLoS One* 2007, 2:e598.
121. Vedder AC, Breunig F, Donker-Koopman WE, et al. Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: effects on antibody formation and GL-3. *Mol Genet Metab* 2008; 94:319-325.
122. Weidemann F, Niemann M, Breunig F, et al. Long-term effects of enzyme replacement therapy on Fabry cardiomyopathy: evidence for a better outcome with early treatment. *Circulation* 2009; 119:524-529.

123. Feriozzi S, Schwarting A, Sunder-Plassmann G, et al. Agalsidase alfa slows the decline in renal function in patients with Fabry disease. *Am J Nephrol* 2008; 29:353-361.
124. Baehner F, Kampmann C, Whybra C, et al. Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIIB study. *J Inher Metab Dis* 2003; 26:617-627.
125. Fabrazyme (agalsidase beta) European Public Assessment Report (EPAR). [<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/fabrazyme/fabrazyme.htm>].
126. Thurberg BL, Rennke H, Colvin RB, et al. Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int* 2002; 62:1933-1946.
127. Eto Y, Ohashi T, Utsunomiya Y, et al. Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: the results of a phase 2 bridging study. *J Inher Metab Dis* 200; 28:575-583.
128. Thurberg BL, Fallon JT, Mitchell R, et al. Cardiac microvascular pathology in Fabry disease: evaluation of endomyocardial biopsies before and after enzyme replacement therapy. *Circulation* 2009 ; 119:2561-2567.
129. Wraith JE, Tytki-Szymanska A, Guffon N, et al. Safety and efficacy of enzyme replacement therapy with agalsidase beta: an international, open-label study in pediatric patients with Fabry disease. *J Pediatr* 2008; 152:563-570.
130. Hilz MJ, Brys M, Marthol H, et al. Enzyme replacement therapy improves function of C-, A-delta-and A-beta-nerve fibers in Fabry neuropathy. *Neurology* 2004, 62:1066-1072.
131. Replagal (agalsidase alfa) European Public Assessment Report (EPAR). [<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/replagal/replagal.htm>].
132. Fabry Registry. [<http://www.lsdregistry.net/fabryregistry/>].
133. Fabry Outcome Survey. [<http://www.globaloutcomesurveys.com>].
134. Mitsias P, Levine SR. Cerebrovascular complications of Fabry's disease. *Ann Neurol* 1996;40:8-17
135. Crutchfield KE, Patronas N, Dambrosia JM et al. Quantitative analysis of cerebral vasculopathy in patients with Fabry disease. *Neurology* 1998, 50 (6) 1746-1749
136. Shah JS, Hughes DA, Sachdev B, et al. Prevalence and clinical significance of cardiac arrhythmia in Anderson-Fabry disease. *Am J Cardiol.* 2005;96:842-846.

137. Acharya, D., Robertson, P., Neal Kay, et al. Arrhythmias in Fabry Cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 2012; 35: 738–740.)
138. DeGraba T, Azhar S, Dignat-George F, et al. Profile of endothelial and leukocytes activation in Fabry patients. *Annals Neurology* 47 (2000) 229-233.
139. Demuth K, Germain DP. Endothelial markers and homocysteine in patients with classic Fabry disease, *Acta Paediatrica suppl.* 91 (2002) 57-61.
140. Shen JS, Meng XL, Moore DF, et al. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 163-168.
141. Gelderman MP, Schiffmann R, Simak J. Elevated endothelial microparticles in Fabry children decrease after enzyme replacement therapy. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) e138-e139.
- Vedder AC, Biro E, Aerts JM, Nieuwland R, Sturk G, Hollak GE. Plasma markers of coagulation and endothelial activation in Fabry disease. *Nephrol, Transpl.* 24 (2009) 3074-3081.
142. Fedi S, Gensini F, Gori AM, Abbate R, et al. Homocysteine and tissue factor pathway inhibitor levels in patients with Fabry disease. *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 2117-2119)
143. Buechner s, Luzzi C, Mannucci M et al. Diagnosis of Anderson-Fabry disease in over seventy-year-old women: description of two cases. *Aging Clin Exp Res* 2006; 18: 340-343
144. Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, et al. Cerebral Hemorrhage in Fabry's disease. *Journal of Human Genetics* (2010) 55, 259-261)
145. Reisin RC, Romero C, Marchesoni C, et al. Brain MRI findings in patients with Fabry disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2011M
146. Morgan SH, Rudge P, Smith SJ, et al. The neurological complications of Anderson–Fabry disease (α -galactosidase A deficiency) – investigation of symptomatic and pre-symptomatic patients. *Q J Med.* 1990;75:491–507
147. MacDermot KD, Holmes A, Miners AH. Anderson–Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. *J Med Genet.* 2001;38:750–60.
148. MacDermot, A Holmes, A H Miners. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females *J Med Genet* 2001;38:769–807
149. Galanos J, Nicholls K, Grigg L, et al. Clinical features of Fabry's disease in Australian patients. *Intern Med J.* 2002;32:575–84.)

150. Vedder AC, Linthorst GE, van Breemen MJ, et al. The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. *J Inher Metab Dis*. 2007 Feb;30(1):68-78. Epub 2007 Jan 5
151. Sims K, Politei J, Banikazemi M, et al. Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry registry. *Stroke*. 2009;40(3):788–794
152. Ginsberg L. Nervous system manifestations of Fabry disease: data from FOS – the Fabry Outcome Survey. Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 23
153. Cabrera-Salaazar MA, O'Rourke E, Charria-Ortiz G, et al. Radiological evidence of early cerebral microvascular disease in young children with Fabry disease. *J Pediatr* 2005; 147: 102-105
154. Tedeschi G, Bonavita S, Banerjee TK, et al. Diffuse central neuronal involvement in Fabry disease, a proton MRS imaging study. *Neurology* 1999; 52:1663-1667;
155. Albrecht J, Dellani PR, Müller MJ, et al. Voxel based analyses of diffusion tensor imaging in Fabry disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 964-969
156. Paavilainen T, Lepomäki V, Saunavaara J, et al. Diffusion tensor imaging and brain volumetry in Fabry disease patients. *Neuroradiology* 2013; 55: 551-558
157. Moore DF, Altarescu G, Craig Barker W, et al. White matter lesions in Fabry disease occur in 'prior' selectively hypometabolic and hyperperfused brain regions. *Brain Research Bulletin* 2003; 62: 231-240
158. Hiltz MJ, Kolody EH, Brys M, Stemper B, et al. Reduced cerebral blood flow velocity and impaired cerebral autoregulation in patients with Fabry disease. *J Neurol* 2004: 251:564-570)
159. Fellgiebel A, Keller I, Marin D, et al. Diagnostic utility of different MRI and MR angiography measures in Fabry disease. *Neurology* 2009: 72:63-68
160. Fellgiebel A, Keller I, Martus P, et al. Basilar artery diameter is a potential screening tool for Fabry disease in young stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 2011;31:294–299
161. Takanashi J, Barkovich J, Dillon WP, et al. T1 hyperintensity in the pulvinar: key imaging feature for diagnosis of Fabry disease. *Am J Neuroradiol* 2003; 24: 916-921
162. Moore DF, Ye F, Schiffmann R; Butman JA. Increased signal intensity in the pulvinar on T1-weighted images: a pathognomonic MR imaging sign of Fabry disease. *Am J Neuroradiol* 2003; 24: 1096-1101

163. Burlina AP, Manara R, Caillaud C, et al. The pulvinar sign: frequency and clinical correlations in Fabry disease. *J Neurol* 2008; 255: 738-744.
164. Borsini W. Il sistema nervoso e la malattia di Fabry. *Therapy Perspectives For rational drug use and disease management*. Anno XIII, N.2, febbraio 2010
165. Schreiber W, Udvardi Astrid, Kristoferitsch W. Chronic meningitis and lacunar stroke in Fabry disease. *J Neurol* 2007; 254: 1447-1449
166. Lidove O, Chauveheid MP, Caillaud C et al. Aseptic meningitis and ischemic stroke in Fabry disease. *Int J Clin Pract* 2009; 63:1663-1667.
167. Chien YH. Novel human pathological mutations: gene symbol: GLA. Disease: Fabry disease. *Hum Genet* 2009;125:336
168. Rolfs A, Böttcher T, Zschesche M, et al. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet*. 2005;366:1794–1796.
169. Brouns R, Sheorajpanday R, Braxel E, et al. Middelheim Fabry Study (MiFaS): a retrospective Belgian study on the prevalence of Fabry disease in young patients with cryptogenic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2007 Jul;109(6):479-84.
170. Wozniak MA, Kittner SJ, Tuhim S, et al. Frequency of unrecognized Fabry disease among young European-American and African-American men with first ischemic stroke. *Stroke*. 2010;41:78–81.
171. Brouns R, Thijs V, Eyskens F, Van den Broeck M, et al. BeFaS Investigators. Belgian Fabry study: prevalence of Fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease. *Stroke*. 2010;41:863–868.
172. Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989;20:864-870
173. SPREAD (Stroke Prevention and Educational Awareness Diffusion) (2012). Italian guidelines for stroke prevention and management, 7th edn. (Release of 14 March 2012). Pierrel Research Italy SpA, Milan.
174. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993 Jan;24(1):35-41
175. Ferri L, Guido C, La Marca G, et al. Fabry disease: polymorphic haplotypes and a novel missense mutation in the GLA gene. *Clinical genetics* 2012; 81: 224-233-

176. Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, et al. European Federation of Neurological Societies; Peripheral Nerve Society. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol*. 2010 Jul;17(7):903-12, e44-9.
177. Bruce S. Schoenberg. Calculating confidence intervals for rates and ratios. Simplified method utilizing tabular values based on the Poisson distribution. *Neuroepidemiology* 1983; 2: 257-265
178. Junaid Shabber, Makiko Yasuda, Edlira Luca, et al. Fabry disease: 45 novel mutations in the α -galactosidase A gene causing the classical phenotype. *Molecular Genetics and Metabolism* 76 (2002) 23-30
179. Marquardt L, Baker R, Segal H, et al. Fabry disease in unselected patients with TIA or stroke: population-based study. *Eur J Neurol*. 2012;19:1427–1432.
180. Dubuc V, Moore DF, Gioia LC, et al. Prevalence of Fabry Disease in Young Patients with Cryptogenic Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2012 Nov 17. pii: S1052-3057(12)00337-0. doi: 0.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.10.005.
181. Sarikaya H, Yilmaz M, Michael N, Miserez AR, et al. Zurich Fabry study - prevalence of Fabry disease in young patients with first cryptogenic ischaemic stroke or TIA. *Eur J Neurol*. 2012 Nov;19(11):1421-6.
182. Rozenfeld PA, Tarabuso A, Ebner R, et al. A successful approach for the detection of Fabry patients in Argentina. *Clin Genet*. 2006 Apr;69(4):344-8.
183. Lukas Jan, Giese Anne-Katrin, Markoff Arseni, et al. Functional characterization of alpha-galactosidase A mutations as a basis for a new classification system in Fabry disease. *PLOS Genetics*. 2013; 9 (8):1-10.
184. van der Tol L, Smid BE, Poorthuis BJHM, et al. A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance. *J Med Genet* 2013;0:1-9
185. Grau AJ, Weimar C, Buggle F, et al. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke*. 2001;32:2559–2566
186. Lee, VH ; Brown, RD ; Mandrekar, JN, et al. Incidence and outcome of cervical artery dissection – a population-based study. *Neurology* 2006; 67:1809-1812

187. Putaala J, Haapaniemi E, Metso AJ, et al. Recurrent ischemic events in young adults after first-ever ischemic stroke. *Ann Neurol* 2010; 68: 661-671
188. Lindley, R I., Warlow, CP., Wardlaw, JM., et al. Interobserver reliability of a clinical classification of acute cerebral infarction. *Stroke* 1993; 24(12): 1801-1804.
189. P. Kaminsky, E. Noel, R. Jaussaud, et al. Multidimensional analysis of clinical symptoms in patients with Fabry's disease. *Int J Clin Pract* 2013; 67 (2): 120–127
190. Charidimou A, Werring DJ. Cerebral microbleeds: detection, mechanisms and clinical challenges. *Futur Neurology* 2011; 6(5): 587-610
191. Veronij MW, van der Lugt A, Ikram MA et al. Prevalence and risk factors for cerebral microbleeds, the Rotterdam scan study. *Neurology* 7: 1208-1214
192. Lesnik Oberstein SAJ, van den Boom R, van Buchem MA et al. Cerebral microbleeds in CADASIL. *Neurology* 2001; 57:1066-1070
193. Dichgans M, Holtmannspotter M, Herzog J et al. Cerebral microbleeds in CADASIL, a gradient-echo magnetic resonance imaging and autopsy study. *Stroke* 2002; 33:67-71
194. Alfadhel M, Sirss S. enzyme replacement therapy for Fabry disease: some answers but more questions. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2011;7 69–82
195. Rombach SM, Twickler TB, Aerts JM, Linthorst GE, Wijburg FA, Hollak CE. Vasculopathy in patients with Fabry disease: current controversies and research directions. *Mol Genet Metab* 2010;99(2):99–108
196. Weidemsnn F, Sanchez-Nino MD, Politei J et al. Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. *Orphanet Journal of rare diseases* 2013.8:116)
197. Moore DF, Scott LT, Gladwin MT, et al. Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: reversal by enzyme replacement therapy. *Circulation*. 2001;104(13):1506–1512
198. Moore DF, Altarescu G, Herscovitch P, Schiffmann R. Enzyme replacement reverses abnormal cerebrovascular responses in Fabry disease. *BMC Neurol*. 2002;2:4
199. Vedder AC, Linthorst GE, Houge G, et al. Treatment of Fabry disease: outcome of a comparative trial with agalsidase alfa or beta at a dose of 0.2 mg/kg. *PLoS One*. 2007;2(7):e598. 13

200. Jardim L, Vedolin L, Schwartz IV, et al. CNS involvement in Fabry disease: clinical and imaging studies before and after 12 months of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2004;27(2):229–240)
201. Schiffmann R, Ries M, Timmons M, et al. Longterm therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(2):345–354;
202. Wilcox WR, Banikazemi M, Guffon N, et al; International Fabry Disease Study Group. Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):65–74.
203. Parenti G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol Med.* 2009;1(5):268–279

Ringraziamenti

Sono molti i colleghi ed amici che vorrei ricordare e ringraziare a conclusione di questo percorso.

Uno speciale ringraziamento va innanzitutto al mio tutor e maestro, professor Domenico Inzitari, con cui collaboro da ormai 10 anni nella ricerca sulla patologia cerebrovascolare.

Grazie al dottor Walter Borsini, che mi ha introdotto e guidato nello studio delle malattie lisosomiali ed in particolare della malattia di Fabry, essendo un neurologo esperto di queste rare condizioni patologiche e riconosciuto a livello nazionale, e alla dottoressa Patrizia Nencini, che mi ha accompagnato con disponibilità e rigore in questo nuovo percorso di studio ed anche addestrato sulle adeguate modalità di ricerca clinica.

Ringrazio il team multidisciplinare per la malattia di Fabry dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi di Firenze, che mi ha assistito in tutto il percorso di formazione scientifica ed assistenziale nei confronti di questa poliedrica patologia, e di cui fanno parte, oltre al dottor Walter Borsini e alla dottoressa Patrizia Nencini, il dottor Alessandro Barilaro (per la neurologia ed in particolare il sistema nervoso periferico), il professor Franco Cecchi, il dottor Iacopo Olivotto, il dottor Gabriele Castelli e la dottoressa Benedetta Tomberli (per la cardiologia), il dottor Lino Cirami ed il dottor Leonardo Caroti (per la nefrologia), la dottoressa Laura Fancelli (per la dermatologia), il dottor Andrea Sodi (per l'oculistica), il dottor Andrea Matucci e la dottoressa Alessandra Voltaggio (per l'immunoallergologia), la professoressa Amelia Morrone, la dottoressa Maria Alice Donati ed il dottor Lorenzo Ferri (laboratorio di malattie Neurometaboliche - Meyer), la professoressa Francesca Torricelli, la dottoressa Elisabetta Pelo, la dottoressa Barbara Minuti e la dottoressa Sabrina Frusconi (laboratorio di Diagnostica Genetica).

Un pensiero particolare è indirizzato ai primari e a tutto il personale medico e infermieristico dei reparti di Stroke Unit e Neurologia, Neurologia 1 e Neurologia 2 dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi per la cortese disponibilità dimostrata durante la fase di selezione dei pazienti e di raccolta dei dati clinici.

Infine un caro saluto a tutti i pazienti con malattia di Fabry che ho conosciuto in questo triennio, nella speranza che questo nostro piccolo contributo scientifico possa aver contribuito a generare informazioni utili nei confronti di questa rara e invalidante malattia ereditaria e a sensibilizzare i medici che lavorano quotidianamente in ambito neurologico sull'importanza della diagnosi precoce di malattia.