
LA VARIANTE DI HANEFELD E LA VARIANTE DI ROLANDO

GIORGIO PINI *et al.*

1. La variante di Hanefeld e il gene *CDKL5*

GIORGIO PINI,¹ STEFANIA BIGONI,² CALABRESE OLGA,² BEATRICE FELLONI,¹ MARIA FLORA SCUSA,¹ PIETRO DI MARCO,¹ PETER O. O. JULU,³ INGEGERD WITT ENGERSTRÖM,⁴ STIG HANSEN,⁵ FLORA APARTOPOULOS,⁵ BENGT ENGERSTRÖM,⁴ ROBERT S. DELAMONT,⁶ ERIC E. J. SMEETS,⁷ LEOPOLD CURFS,⁷ FRANCESCA ARIANI,⁸ ANNA ROMANELLI,⁹ FABRIZIO BIANCHI,⁹ MICHELE ZAPPELLA¹

¹Rett Center of the Tuscany, Versilia Hospital, Lido di Camaiore, Italy - ²Medical Genetic Section, University Hospital of Ferrara, Italy - ³Wingate Institute of Neurogastroenterology, Queen Mary School of Medicine and Dentistry, Whitechapel, London, UK - ⁴Swedish Rett Centre, Osteraund, Sweden - ⁵Institute of Neurological Sciences, South Glasgow University Hospitals, Glasgow, UK - ⁶Department of Clinical Neuroscience, Institute of Psychiatry, King's College London, London, UK. - ⁷Department of Clinical Genetics, Academic Hospital Maastricht, Maastricht, The Netherlands. - ⁸Dipartimento di genetica, Siena, Italy - ⁹CNR- Italian National Research Council, Pisa, Italy

Abstract

Obiettivi: La variante di Hanefeld della sindrome di Rett (RTT) è un grave disturbo dello sviluppo neuropsichico associato a mutazione del gene "X-linked cyclin-dependent kinase-like 5" (*CDKL5*). In questo studio sono descritte 7 pazienti con variante di Hanefeld

Metodi: Sono stati raccolti i dati clinici dei soggetti, compreso il punteggio di gravità in accordo all'"International Scoring System". È stata effettuata inoltre una valutazione del sistema nervoso autonomo con il Neuroscopio e un'indagine molecolare del gene *MECP2* e/o *CDKL5*.

Risultati: Delle 7 pazienti, 5 avevano una mutazione del gene *CDKL5* (N71D, R178W, R55fsX74, E364X, delezione dell'esone 7-8). L'età media alla prima valutazione era di 11 anni (range 2-26). Le pazienti presentavano esordio precoce delle crisi epilettiche (primi 2 mesi di vita), di tipo generalizzato tonico-clonico (2 casi), parziale clonico (3 casi), "spasmi infantili" (1 caso) e con successiva evoluzione in crisi generalizzate con "spasmi infantili" o "tonico-cloniche", parziali, in 1 caso di tipo tonico. Le crisi erano controllate in 3 casi. Risultavano soddisfatti alcuni criteri della RTT, quali circonferenza cranica (COF) normale alla nascita, ritardo mentale e stereotipie manuali. La successiva decelerazione della COF è stata riscontrata in 3 casi. I punteggi all'"International Scoring System" erano compresi nel range da lieve a grave. L'esecuzione del Neuroscope ha permesso di rilevare un fenotipo cardiorespiratorio "flebile" (nei casi senza mutazione *CDKL5*) e "forzato" (nei casi con mutazione *CDKL5*).

Conclusioni: La variante di Hanefeld potrebbe essere considerata un'entità a sé stante per le caratteristiche cliniche, genetiche e cardio-respiratorie.

Introduzione

La sindrome di Rett (RTT) è un grave disturbo dello sviluppo, predominante nel sesso femminile, caratterizzato da un ampio spettro di manifestazioni cliniche. Nel 1999 è stata identificata la mutazione del gene, *MECP2*, che è alterato nel 90-95% dei casi con forma classica. Accanto alla forma classica esistono forme atipiche della RTT (descritte in altra parte del volume). In questo articolo prendiamo in esame la variante con “esordio precoce delle crisi” con comparsa di crisi epilettiche prima della regressione (Hanefeld F., 1985; Hagberg B., 1985; Hagberg B. A., 1994; Goutieres F., 1986). La prima descrizione di tale variante risale al 1984 da parte di Hanefeld (comunicazione personale): si trattava di una bambina che presentava spasmi infantili, insorti nel primo anno di vita; successivamente la paziente ha sviluppato quasi tutti i sintomi della RTT classica con crisi epilettiche resistenti alla terapia farmacologica. Solo recentemente la variante di Hanefeld è stata associata a mutazioni del gene “Cyclin dependent Kinase-like 5” o *CDKL5* (Kalscheuer V. M., 2003), precedentemente conosciuto come “Kinasi serina/treonina 9” o STK9. In particolare le prime mutazioni di *CDKL5* descritte erano translocazioni X/autosomiche in due bambine che, oltre al ritardo dello sviluppo, avevano presentato crisi epilettiche a tipo spasmi infantili con ipsaritmia. Questi sintomi configuravano la cosiddetta sindrome di West X-linked (*ISSX*), un disturbo attribuito principalmente alla mutazione nel gene “aristaless related homeobox” (*ARX*). Più recentemente, sono state riportate mutazioni puntiformi nel gene *CDKL5* in pazienti con variante atipica della RTT, spasmi infantili e grave ritardo di sviluppo. Il *CDKL5* è un membro della famiglia genica delle kinasi serina-treonina. Il gene *CDKL5* è ubiquitariamente espresso in diverse linee cellulari e tessuti, in una fase precoce dello sviluppo. La sua localizzazione nucleare suggerisce un possibile ruolo nella regolazione genica. Dato che mutazioni sia del gene *MECP2* che del *CDKL5* conducono ad un fenotipo clinico simile, è stata ipotizzata una cooperazione tra i due geni: in particolare è possibile che il *MECP2* sia soggetto a fosforilazione da parte di *CDKL5*; in alternativa il *CDKL5* potrebbe fosforilare una seconda proteina che dovrebbe de-fosforilare il *MECP2*.

Riguardo alla caratterizzazione fenotipica, negli ultimi anni alcuni au-

tori hanno descritto diversi pazienti (ventinove) con mutazioni a carico del gene *CDKL5* (Kalscheuer V. M., 2003; Weaving L. S., 2004; Christodoulou J., 2004; Tao J., 2004; Li M. R., 2007). La maggior parte di questi pazienti presentava una variante di RTT; gli altri mostravano quadri caratterizzati da encefalopatia mioclonica o da epilessia e ritardo mentale o da autismo. Tutti i pazienti descritti, tranne uno, avevano crisi epilettiche nel corso della loro vita, con età media di esordio di 2 mesi. Le manifestazioni epilettiche erano rappresentate principalmente da spasmi infantili, accessi mioclonici, crisi generalizzate tonico-cloniche, e crisi toniche e, in una piccola percentuale, da assenze e crisi parziali complesse. Le crisi epilettiche in tutti i casi risultavano farmacoresistenti. Il tracciato elettroencefalografico evidenziava un pattern ipsaritmico, attività focale o multifocale, onde lente diffuse ad alto voltaggio.

In questo studio abbiamo descritto le caratteristiche cliniche di 5 pazienti con variante Hanefeld di RTT con mutazione a carico del gene *CDKL5* (Hanefeld+) e 2 pazienti con variante Hanefeld di RTT senza la mutazione (Hanefeld-).

Materiali e Metodi

Nel presente studio sono state selezionate 7 bambine con RTT variante Hanefeld su un totale di 117 di casi afferiti al “Centro di Riferimento Regionale per la Sindrome di Rett” dell’Ospedale Versilia di Lido di Camaiore e all’Università degli studi di Ferrara dall’ottobre 2006 a marzo 2009. La diagnosi è stata formulata in accordo ai criteri internazionali, attualmente riconosciuti dalla letteratura specialistica (Hagberg B., 2002). In tutti i soggetti la diagnosi clinica era corredata da un’indagine molecolare di studio del gene *MECP2* o *CDKL5* (in svariati centri di Genetica italiani ed esteri). Sul totale di casi afferiti, 100 pazienti (85,5%) mostrano una mutazione a carico del gene *MECP2*; delle 7 persone affette da variante di Hanefeld, 5 bambine presentano una mutazione a carico del gene *CDKL5*, mentre 2 bambine risultano negative per mutazioni sia a carico del gene *MECP2* che del gene *CDKL5*.

Il protocollo di valutazione ha previsto:

- Valutazione neuropsichiatrica con realizzazione di una cartella clinica

ed esame neurologico;

- Compilazione di una scheda di valutazione delle caratteristiche personali e patologiche, strumento internazionalmente riconosciuto (Kerr A. M., 2001): l'International Scoring System (ISS);

- Valutazione del fenotipo cardio-respiratorio con il Neuroscope (Medifit Instruments Ltd., London, UK). (Julu P. O., 2001; Julu P. O., 2008).

Strumenti

Clinical score. La scala è costituita da 21 items, relativi a 21 caratteristiche tipiche della Sindrome di Rett, distribuiti in 5 sottoscale: "Crescita e Sviluppo" (circonferenza cranica e progressione dello sviluppo nel primo anno di vita, circonferenza cranica, peso, altezza attuali); "Apparato Muscolo-Scheletrico" (tono muscolare, scoliosi, contratture articolari); "Motricità" (deambulazione, stereotipie manuali, disturbi del movimento, uso volontario delle mani); "Compromissione Corticale" (epilessia, grado di disabilità mentale, sviluppo del linguaggio) e "Compromissione Funzioni Autonomiche" (disturbi della masticazione-deglutizione, disritmia respiratoria, circolazione periferica, agitazione psicomotoria, ritmo sonno/veglia). Per ogni item viene attribuito un punteggio da 0 a 2: "0" corrisponde ad "assenza del sintomo", "1" ad un sintomo lieve o intermittente, "2" a presenza dominante o costante. Un punteggio totale compreso tra "0-15" corrisponde ad un livello di gravità "lieve"; un punteggio tra "16-20" ad un livello di gravità "medio" e un punteggio "> 20" ad un livello "grave".

Neuroscope. Strumento importante nel classificare e comprendere molto fenomeni clinici osservati nelle bambine RTT. La valutazione consiste nel monitoraggio quantitativo e qualitativo della maturazione cerebrale e dello sviluppo nella sindrome di Rett, attraverso una procedura non invasiva, in cui vengono registrate le seguenti funzioni: funzioni cardio-respiratorie, tono vagale cardiaco (CVT), frequenza cardiaca (HR), segni vitali respiratori (frequenza e modelli respiratori, pressione parziale transcutanea di ossigeno (pO₂) e anidride carbonica (pCO₂) e parametri antropometrici come la circonferenza cranica occipito-frontale (COF), indici di altezza e massa corporea (BMI)). A tutto questo viene unita una registrazione elettroencefalografia. L'esame dura un'ora, viene video-registrato e tutti i

parametri vengono misurati in tempo reale e simultaneamente. L'analisi computerizzata delle varie tracce fornisce, oltre che la misurazione delle singole anomalie (presenza, durata nell'unità di tempo, percentuale, etc.), l'indicazione di un fenotipo cardio-respiratorio per ogni paziente (flebile, forzato, apneustico).

Risultati

Il campione è formato da 7 soggetti di sesso femminile. Tutte le bambine presentano un fenotipo clinico della variante di Hanefeld: 5 soggetti mostrano la mutazione a carico del gene *CDKL5*, 2 soggetti invece risultano *CDKL5* negativi. I tipi di mutazione riscontrati sono: mutazione "missenso" (2 casi), mutazione "frameshift" (1 caso), mutazione "non senso" (1 caso) e delezione (1 caso). L'età media del campione alla valutazione clinico-strumentale è di 11 anni (Range 2-26). Alla nascita 4 pazienti presentavano una circonferenza cranica nel range della norma, una bambina aveva un valore maggiore del 95° percentile. In 2 bambine la crescita della circonferenza cranica è progredita regolarmente, mentre 3 pazienti hanno presentato una decelerazione della crescita, sin dal primo anno. Tutte le pazienti hanno presentato un grave ritardo dello sviluppo psicomotorio: 3 pazienti mostravano un quadro di ipotonia generalizzata, mentre le altre 2 un tono muscolare nella norma. La deambulazione autonoma è stata acquisita in 3 casi ed era di tipo atassico; negli altri casi non è stata acquisita. Lo sviluppo cognitivo, valutato attraverso l'osservazione clinica diretta, risultava gravemente compromesso in tutti i casi ma, secondo la valutazione della Kerr per la sindrome di Rett, rientrava in una entità medio-grave. Il linguaggio verbale era assente in tutti i casi, anche se una ragazza in particolare aveva acquisito delle modalità comunicative eccellenti e risultava in grado di indicare lettere singole, ricostruire parole, rispondere a semplici domande ed, addirittura, a risolvere qualche problema matematico. Tutti i soggetti presentavano stereotipie manuali a tipo lavaggio e mano-bocca, in 3 casi costanti e in 2 intermittenti. Tutti i soggetti hanno presentato una diagnosi di epilessia in epoca precoce: l'esordio delle crisi è avvenuto in 3 casi nel primo mese di vita, in una paziente nel terzo mese, e in un'altra nel quarto mese. L'età media di esordio delle crisi è stata quindi di circa 2,2 mesi.

Le manifestazioni epilettiche all'esordio erano rappresentate da crisi generalizzate tonico-cloniche, spasmi infantili, crisi parziali di tipo clonico (in un caso multifocali e in un altro localizzate agli arti inferiori). L'evoluzione successiva risultava polimorfica: spasmi in flessione, crisi generalizzate tonico-cloniche, crisi parziali di cui in un caso di tipo tonico-versive. Una farmaco-resistenza era riscontrata in 4 casi; in 1 caso l'epilessia risultava sufficientemente controllata dalla terapia farmacologica. Il pattern elettroencefalografico evidenziava anomalie diffuse ed in 2 casi a prevalente localizzazione fronto-temporale mentre in un altro occipitale; in un caso non erano presenti anomalie significative. Il quadro di RMN encefalo mostrava in un caso un aumento aspecifico delle cavità ventricolari e degli spazi liquorali in sede fronto-temporale, in un altro una lieve asimmetria del corno occipitale, mentre in 3 casi non era evidente alcuna alterazione.

Il fenotipo cardio-respiratorio evidenziato mediante l'esecuzione dell'esame neuroscopico è risultato di tipo flebile nella paziente più piccola e di tipo forzato nelle altre 4. La durata media delle anomalie era di 28,8% nell'arco di un'ora. Le anomalie respiratorie più frequenti risultavano: tachipnea (11,7%), breath-holding (3,36%), manovra di Valsalva (0,79%) e apnea (0,62%). Il tono vagale cardiaco, registrato in stato di quiete, risultava in media di 5,2 con un range compreso tra 2,2-7,6 (lvs: 6-19); il tono vagale cardiaco massimo era in media di 26,7 con range di 7-40. Il grado di compromissione, valutato secondo l'ISS è risultato di grado lieve-medio (range 14-19).

Il secondo sottogruppo è formato dai 2 soggetti con RTT variante Hanefeld che non presentano la mutazione a carico del gene *CDKL5*. Alla nascita le due pazienti presentavano una circonferenza cranica nel range della norma; una bambina ha mostrato una decelerazione della crescita a partire dal quarto mese di vita. Tutte le pazienti hanno presentato un grave ritardo dello sviluppo psicomotorio: 1 paziente mostrava un quadro di ipertonìa generalizzata (maggiore all'emilato dx), mentre l'altra paziente aveva una lieve anomalia del tono muscolare. La deambulazione autonoma è stata acquisita in un caso ed era di tipo atassico; nell'altro caso non è stata acquisita. Lo sviluppo cognitivo, valutato attraverso l'osservazione clinica diretta, risultava compromesso in entrambi i casi ed era di entità grave, secondo la valutazione di Kerr. Il linguaggio era assente in ambedue i casi. In una bambina sono comparse stereotipie manuali a tipo mano-

bocca. Tutti i soggetti hanno presentato una diagnosi di epilessia in epoca precoce: l'esordio delle crisi è avvenuto in 1 caso nel primo mese di vita e in un altro nel secondo mese. L'età media di esordio è di circa 1 mese. Le manifestazioni epilettiche all'esordio erano rappresentate da convulsioni generalizzate in un caso e da crisi cloniche nell'altro. Il quadro di RMN encefalo mostrava in un caso un'atrofia sopra e sottotentoriale, nell'altro non era evidente alcuna alterazione. Entrambe le pazienti sono state trattate con più farmaci e presentavano, all'ultima osservazione, un buon compenso clinico. Il pattern elettroencefalografico evidenziava anomalie diffuse in una paziente mentre nell'altra le anomalie non risultavano specifiche. Il fenotipo cardio-respiratorio dei due soggetti, evidenziato mediante l'esecuzione dell'esame neuroscopico, è risultato di tipo flebile. La durata media delle anomalie era di 33,4% nell'arco di un'ora. Le anomalie respiratorie più frequenti risultavano: breath-hold (5,98%), tachipnea (4,93%), apnea (2,95%) e manovra di Valsalva (0,45%). Il tono vagale cardiaco, registrato in stato di quiete, risultava in media di 4, con un range compreso tra 2-6 (lvs: 6-19); il tono vagale cardiaco massimo era in media di 29 con range di 8-50. Il grado di compromissione, valutato secondo la scala "clinical score" è risultato di grado grave (range 24-30).

Discussione

In questo studio tutti i pazienti esaminati manifestano le caratteristiche cliniche del disturbo di Hanefeld, suggerendo che la mutazione del gene *CDKL5* dovrebbe essere sempre investigata nei casi in cui è stata posta la diagnosi clinica di Sindrome di Rett con esordio precoce delle convulsioni ed in generale nei casi di Sindrome di Rett senza mutazioni del *MECP2*. Comunque, dal momento che il primo caso descritto da Hanefeld presentava una mutazione del gene *MECP2*, la diagnosi di tale disturbo dovrebbe essere basata principalmente su criteri clinici. Il quadro fenotipico delle bambine analizzate è caratterizzato da un esordio precoce delle manifestazioni epilettiche (primi 2 mesi), in entrambi i sottogruppi. L'epilessia nei primi 6 mesi di vita è un evento estremamente raro in femmine con le classiche caratteristiche di RTT e mutazioni *MECP2*. Inoltre le pazienti rispondevano ai criteri diagnostici per la RTT quali la COF normale alla nascita,

successiva decelerazione della crescita della COF, ritardo dello sviluppo psicomotorio, ritardo mentale, assenza di linguaggio e comparsa di stereotipie manuali. Tuttavia solo alcune di queste manifestazioni sono state riscontrate in tutti i casi considerati. Nell'ambito di tali caratteristiche si è comunque evidenziata una certa variabilità fenotipica: in effetti 4 pazienti hanno acquisito la deambulazione autonoma seppur di tipo atassico, mentre le altre 3 hanno presentato un quadro di ritardo motorio più grave. Anche le stereotipie manuali non sono risultate dominanti in tutte le pazienti, a differenza della forma classica di RTT. La decelerazione della crescita cranica è stata invece evidenziata in 3 pazienti tra quelle con mutazione *CDKL5* positiva e nelle 2 senza mutazione *CDKL5*. Per quanto riguarda il fenotipo epilettico, all'esordio si è riscontrata la presenza di tre tipi di crisi: crisi generalizzate tonico-cloniche (2 casi), crisi parziali di tipo clonico (4 casi) e crisi a tipo "spasmi infantili" (1 caso). L'evoluzione successiva ha mostrato, in accordo ai dati in letteratura, una certa variabilità da crisi generalizzate con "spasmi infantili", crisi generalizzate tonico-cloniche a crisi parziali, in 1 caso di tipo tonico. Non si sono invece documentate manifestazioni critiche di tipo mioclonico, che definiscono la cosiddetta "encefalopatia mioclonica" nelle mutazioni *CDKL5* (Buoni S., 2006).

Un discreto controllo delle crisi epilettiche è stato raggiunto in 3 casi, due dei quali senza mutazione *CDKL5*, mentre negli altri si è riscontrata una farmaco-resistenza nonostante l'utilizzo di diversi farmaci anche in associazione. Il pattern elettroencefalografico non è risultato caratteristico mostrando alterazioni diffuse solo in 3 casi con una prevalenza di localizzazione (fronto-temporale, occipitale). Alcuni Autori (Grosso S., 2007) hanno riportato che un'attività temporale o fronto-temporale era molto frequente suggerendo una patologia focale. Tale dato non è sorprendente poiché gli studi sperimentali hanno dimostrato che un'alta espressione di *CDKL5* è raggiunta nei primi giorni di vita post-natale nella neocortex, nella corteccia piriforme e nelle strutture del lobo temporale mediale (Archer H. L., 2006). Il quadro RMN encefalo non presentava comunque alterazioni specifiche. In riferimento al sistema nervoso autonomo alcune delle pazienti mostravano sintomi quali piedi/mani freddi, stipsi, disturbi del sonno; erano inoltre presenti alterazioni del pattern respiratorio quali breathholds, apnee e manovre di Valsalva e i fenotipi cardio-respiratori più

rappresentati erano quello di tipo forzato (casi Hanefeld+) e flebile (casi Hanefeld-). In relazione al tipo di mutazione le due pazienti con mutazione “missenso” non presentavano un fenotipo più lieve come invece riportato in alcuni precedenti studi (Tao J., 2004; Evans J. C, 2005). In tali pazienti inoltre erano più evidenti tratti autistici, quali evitamento dello sguardo, chiusura relazionale. La mutazione “frameshift” comporta una perdita della maggior parte della proteina *CDKL5*; in letteratura viene riportato che la perdita di funzione della proteina *CDKL5* è associata a un quadro grave di ISSX (Kalscheuer V. M, 2003). Nel nostro studio, invece, la paziente con tale mutazione ha presentato un quadro di ritardo motorio, ma ha acquisito la capacità di deambulare a 6 anni e le manifestazioni epilettiche, esordite a 1 mese, nella successiva evoluzione risultavano controllate dalla terapia farmacologica.

Per concludere si sottolinea che nel nostro campione l'epilessia non sempre risulta farmaco-resistente, che nelle varianti con mutazione del *CDKL5* i livelli cognitivi sono molto variabili e che, infine, sembra profilarsi per la prima volta nell'ambito delle varianti la correlazione tra forma clinica e fenotipo cardiorespiratorio forzato. Considerata la mutevole sintomatologia, i quadri clinici differenti e la diversa etiologia potremmo più correttamente riferirci a una nuova entità clinica denominata “disturbo di Hanefeld”.^(*)

^(*) La raccolta dei dati in questo articolo è stata possibile anche grazie al lavoro svolto in diversi laboratori di genetica molecolare italiani (Siena, Padova, Troina, Milano, Firenze e Ferrara) e statunitensi (Huston e Greenwood) che, su richiesta delle singole famiglie, hanno eseguito gli esami del *MECP2* e del *CDKL5* e naturalmente vogliamo ringraziare i genitori delle bambine affette che hanno deciso di farle visitare al Centro Rett dell'Ospedale Versilia. Il nostro lavoro è stato realizzato nell'ambito di un finanziamento della Regione Toscana, del progetto europeo EuroRett ed in collaborazione con l'ESRRA (European Scientific Research Rett Association) www.esrra.eu.

BIBLIOGRAFIA

- ARIANI F. *et al.* (2008), *FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome*. in "Am J Hum Genet", 83 (1), 89-93.
- HANEFELD F. (1985), *The clinical pattern of the Rett Syndrome*, in "Brain Dev", 1985, 7, 320-325.
- HAGBERG B. *et al.* (1985), *Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion*, in "Brain Dev", 7, 372-373.
- HAGBERG B. *et al.* (1994), *Rett variants: a suggested model for inclusion criteria*, "Pediatr Neurol", 11, 5-11.
- GOUTIERES F. *et al.* (1986), *Atypical forms of Rett syndrome*, in "Am J Med Genet" Suppl. 1, 183-194.
- KALSCHUEER V. M. *et al.* (2003), *Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation*, in "Am J Hum Genet", 72, 1401-1411.
- WEAVING L. S. *et al.* (2004), *Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation*, in "Am J Hum Genet", 75, 1079-1093.
- TAO J. *et al.* (2004), *Mutations in the X-linked cyclin-dependent Kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation*, in "Am J Hum Genet", 75, 1149-1154.
- LI M. R. *et al.* (2007), *MECP2 and CDKL5 gene mutation analysis in Chinese patients with Rett Syndrome*, in "Am J Hum Genet", 52, 38-47.
- HAGBERG B. *et al.* (2002), *An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett Syndrome*, in "Eur J Paediatr Neurol", 6, 293-297.
- KERR A. M. *et al.* (2001), *Guidelines for reporting clinical features in cases with MECP2 mutations*, in "Brain Dev", 23 (4), 208-211.
- JULU P. O. O. *et al.* (2001), *Characterisation of breathing and associated central autonomic dysfunction in the Rett disorder*, in "Arch Dis Child", 85 (1), 29-37.
- JULU P. O. O. *et al.* (2008), *Cardiorespiratory challenges in Rett syndrome*, in "Lancet", 371 (9629), 1981-1983.
- BUONI S. *et al.* (2006), *Myoclonic encephalopathy in the CDKL5 gene mutation*, in "Clin Neurophysiol", 117, 223-227.
- ARCHER H. L. *et al.* (2006), *CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures and severe mental retardation in female patients*, "J Med Genet"; 43 (9), 729-734.
- GROSSO S. *et al.* (2007), *Seizures and electroencephalographic findings in CDKL5 mutations: case report and review*, in "Brain dev", 29: 239-242.
- EVANS J. C. *et al.* (2005), *Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5*, in "Eur J Hum Genet", 13: 1113-1120.

2. La variante di Rolando

G. PINI,¹ S. BIGONI,² A. FERLINI,² S. CARTURAN,² I. BALDI,¹ B. FELLONI,¹ M. F. SCUSA,¹ P. DI MARCO,¹ PETER O. O. JULU,³ I. WITT ENGERSTRÖM,⁴ S. HANSEN,⁵ F. APARTOPOULOS,⁵ B. ENGERSTRÖM,⁴ R. S. DELAMONT,⁶ E. E. J. SMEETS,⁷ N. HALBACH,⁷ L. CURFS,⁷ A. BERARDINELLI,⁸ S. ORCESI,⁸ A. ROMANELLI,⁹ F. BIANCHI,⁹ M. ZAPPELLA¹

¹Rett Centre of the Tuscany, Versilia Hospital, Lido di Camaiore, Italy - ²Medical Genetic Section, University Hospital of Ferrara, Italy - ³Wingate Institute of Neurogastroenterology, Queen Mary School of Medicine and Dentistry, Whitechapel, London, UK. - ⁴Swedish Rett Centre, Ostersund, Sweden - ⁵Institute of Neurological Sciences, South Glasgow University Hospitals, Glasgow, UK - ⁶Department of Clinical Neuroscience, Institute of Psychiatry, King's College London, London, UK. - ⁷Department of Clinical Genetics, Academic Hospital Maastricht, Maastricht, The Netherlands. - ⁸Istituto Neurologico Mondino, Pavia, Italy - ⁹CNR-Italian National Research Council, Pisa, Italy

Abstract

Obiettivi: La sindrome di Rett (RTT) è un disturbo dello sviluppo neurologico, la cui variante congenita è caratterizzata da precoce ritardo psicomotorio, ipotonia ed alterazioni elettroencefalografiche, ed assenza dell'iniziale tipico periodo asintomatico.

Metodi: Campione di 7 bambine con variante congenita di RTT afferite al "Centro di riferimento regionale della Sindrome di Rett" dell'Ospedale Versilia e all'Università di Ferrara, dal 2006 ad oggi. Dati raccolti: dati clinici e compilazione dell'"International Scoring System". A supporto della diagnosi, eseguita l'analisi molecolare del gene MECP2. In 4 soggetti è stata effettuata valutazione del sistema nervoso autonomo con Neuroscope.

Risultati: L'età media del campione era di 3 anni e 1/2. I soggetti avevano in comune: normale circonferenza cranica alla nascita, con successiva decelerazione nella maggior parte dei casi; anomalie non-specifiche dello sviluppo precoce; grave deficit cognitivo; stereotipie; parametri auxologici sopra il 50° centile in 4 casi. Il pattern elettroencefalografico in quasi tutti mostrava anomalie. Il grado di compromissione era grave in 4 casi. Il fenotipo cardiorespiratorio maggiormente rappresentato era "forzato". Tutte le pazienti presentavano mutazioni MECP2.

Conclusioni: La variante congenita è stata riscontrata nel 5.9% dei soggetti con RTT afferiti. Una mutazione del gene MECP2 è stata identificata in tutti i casi. Questa variante di RTT sembra essere parte della forma classica, ma con insorgenza più precoce e con decorso più severo.

Introduzione

La sindrome di Rett (RTT) è un grave disturbo dello sviluppo neurologico, predominante nel sesso femminile, caratterizzato da un ampio spettro di manifestazioni cliniche. Tra le varianti, quella congenita (variante di Rolando) si caratterizza per un disturbo motorio evidente dalla nascita. La prima descrizione della variante congenita della sindrome di Rett risale a venticinque anni addietro ad opera di Susanna Rolando (Rolando S., 1985). In questa forma le bambine sin dai primi mesi di vita presentano un ritardo psicomotorio, ipotonia e alterazioni elettroencefalografiche, senza evidenza di epilessia precoce. Nella letteratura scientifica rappresenta circa il 5% di tutti i casi di RTT, ma è probabilmente una stima per difetto (Fukuda T., 2005; Pozzi M. C., 2003; Huppke P., 2000; Hagberg B. A., 1994; Goutieres F., 1986; Rolando S., 1985). Non in tutti i casi di variante di Rolando sono state identificate mutazioni del gene *MECP2*; in un caso è stato ipotizzato l'interessamento di un autosoma (Wahlstrom J., 1999): nell'articolo viene descritta una bambina con questa variante che presentava una delezione della porzione distale del braccio corto del cromosoma 3. Recentemente sono stati riportati due casi di pazienti affette dalla variante di Rolando con mutazioni troncanti del gene *FOXG1*, che codifica per un repressore trascrizionale cerebrale e gioca un ruolo essenziale nello sviluppo precoce (Ariani F., 2008).

Materiale e Metodi

Nel presente studio sono state selezionate 7 bambine con RTT variante congenita su un totale di 120 casi afferiti al "Centro di Riferimento Regionale per la Sindrome di Rett" dell'Ospedale Versilia di Lido di Camaiore e all'Università degli Studi di Ferrara da ottobre 2006 a luglio 2009. La diagnosi è stata formulata in accordo ai criteri internazionali, attualmente riconosciuti dalla letteratura specialistica. In tutti i soggetti la diagnosi clinica è accompagnata da indagini molecolari di studio del gene *MECP2*, eseguite in diversi laboratori italiani. Il protocollo di valutazione è quello descritto nello studio precedente su "La variante di Hanefeld e il gene *CDKL5*". In particolare, oltre alla valutazione clinica a tutte le pazienti, è stata som-

ministrata la scala ISS (l'International Scoring System), mentre una valutazione completa del funzionamento del sistema nervoso autonomo con Neuroscope è stato possibile solo per 4 pazienti.

Risultati

Nel nostro studio la percentuale della variante congenita è risultata 5.2% di tutte le bambine RTT. L'età media del campione alla valutazione clinico-strumentale è di 3 anni e mezzo (range 2-6 anni). Si tratta pertanto di pazienti che sono giunte in consultazione in epoca precoce. Tutte le pazienti presentavano mutazioni del gene *MECP2* e specificatamente: "missenso" in 2 bambine (*R160W*, *T158M*), "non senso" in 4 (*R168X*, *R168X*, *R255X*, *R270X*), e "frameshift" in 1 caso (*ins/dupGGCCex4*). Alla nascita tutte le pazienti presentavano una circonferenza cranica (COF) nella norma. Il peso alla nascita è stato riportato in 4 casi e risultava nella norma, mentre negli altri il dato non era documentato. In epoca post-natale solo 2 bambine hanno mostrato una evidente decelerazione della crescita della COF, in 4 bambine sarebbe progredita regolarmente e in 1 bambina il dato è dubbio. Alla nascita 2 bambine hanno presentato segni di sofferenza neonatale (asfissia); 3 casi mostravano alcune anomalie neurologiche, quali atteggiamento in torcicollo, tremori, varo-supinazione dei piedi, mentre in 2 casi non erano evidenti alterazioni dello sviluppo. Lo sviluppo psicomotorio successivo è stato caratterizzato da importante ritardo; il tono muscolare era ridotto: quasi tutte le bambine presentavano infatti ipotonia generalizzata. La deambulazione autonoma è stata acquisita solo da una bambina, ma era comunque difficoltosa. L'utilizzo volontario delle mani ha subito una riduzione in quasi tutti i casi a partire dai 13-15 mesi, soltanto una bambina ha mantenuto la capacità di afferrare oggetti anche pesanti. In riferimento alle stereotipie manuali, 4 soggetti presentavano movimenti a tipo lavaggio e mano-bocca, 2 soggetti movimenti di altro tipo e 1 soggetto non presentava stereotipie evidenti.

Lo sviluppo cognitivo, valutato attraverso l'osservazione clinica diretta, risultava compromesso in tutti i casi. Il linguaggio espressivo era assente in 5 soggetti, mentre 2 bambine producevano poche parole isolate. Una diagnosi di epilessia è stata formulata in 3 soggetti di cui 1 ha presentato

convulsioni a 7 mesi di vita. Il pattern elettroencefalografico in 6 soggetti evidenziava punte-onda, punte o anomalie diffuse a prevalente localizzazione fronto-centro-temporale, in 1 caso non era disponibile.

Il quadro di RMN encefalo mostrava in 2 casi lieve iperintensità della sostanza bianca, una in regione subinsulare bilaterale e periventricolare posteriore ed una in regione periventricolare e in sede trigonale posteriore bilaterale. In 2 casi non era evidente alcuna alterazione, in altri 3 non è stato valutato. L'accrescimento ponderale è risultato maggiore del 10° centile in 4 pazienti, in 2 casi era minore del 3° centile e in 1 caso il peso era inferiore al 3° centile, mentre l'altezza risultava compresa tra il 3°-10° centile. Il fenotipo cardio-respiratorio evidenziato mediante l'esecuzione dell'esame neuroscopico è risultato di tipo flebile in 1 caso e di tipo forzato 3 casi; in 3 casi l'esame non è stato eseguito. Il tono vagale cardiaco, registrato in stato di quiete, risultava in media di 8.5, con un range compreso tra 3-22 (valori normali di lvs: 6-19). Le anomalie respiratorie più frequentemente rappresentate erano: tachipnea (media del 16.24%), breathhold (5.64%), apnea (3.44%) e manovra di Valsalva (1.81%). Il grado di compromissione, valutato secondo la scala "clinical score", è risultato di grado lieve in 1 caso (punteggio 13), medio in 2 casi (range 18-19) e di grado grave in 4 casi (range 21-24).

Discussione

La frequenza della variante congenita nel nostro campione è simile a quella riportata in letteratura. Dalla descrizione di questo campione di pazienti, emerge che la variante congenita di RTT presenta un fenotipo clinico caratterizzato da:

- Normale COF alla nascita (tranne 1 caso di microcefalia), con successiva non costante decelerazione;
- Anomalie aspecifiche precoci dello sviluppo psicomotorio, con presenza di importante ipotonia generalizzata e assenza di acquisizione della deambulazione autonoma in tutti i casi;
- Deficit cognitivo severo con assenza di linguaggio;
- Riscontro di valori ponderali usualmente nella norma;
- Evidenza di stereotipie manuali a tipo lavaggio e mano-bocca;

- Presenza di anomalie elettroencefalografiche;
- Presenza di anomalie respiratorie (almeno nei casi valutati strumentalmente).

In riferimento alla RTT classica, in queste pazienti non è stato possibile identificare un periodo di regressione chiaro. Inoltre l'outcome motorio sembra peggiore in quanto nessuna delle pazienti è in grado di deambulare autonomamente. Un'altra caratteristica differenziale è costituita da una crescita somatica che rientra nella norma, mentre nelle pazienti con RTT classica viene di solito riportato un deficit staturo-ponderale. Concordanti risultano invece la presenza di stereotipie manuali, il deterioramento mentale con assenza di linguaggio e le anomalie di tipo respiratorio. Nel nostro studio, inoltre, tutte le pazienti mostrano una mutazione a carico del gene *MECP2*, mentre in letteratura viene evidenziato un minor riscontro di detta mutazione rispetto alla forma classica. In alcuni lavori vengono riportate infatti percentuali comprese tra il 10 e il 20% (10).

Conclusioni

In base a queste caratteristiche cliniche la variante congenita di RTT si configura come una forma meno benigna rispetto alla forma classica. Per quanto i casi descritti in letteratura riconoscano la tipica evoluzione in stadi ordinati, nella nostra casistica è stato difficile evidenziare una fase netta di regressione delle competenze motorie, già duramente colpite, se non per quanto concerne la comparsa delle disprassie manuali. Nei casi di negatività di alterazioni del gene *MECP2* e fenotipo clinico evocativo di una forma congenita è opportuno escludere mutazioni del gene *FOXG1*. La forma congenita rappresenta una rarità (5%) nella già rara RTT (1:12000/15000) ed è pertanto indispensabile accorpare l'intera casistica nazionale per poter delineare eventuali corrispondenze tra genotipo e fenotipo ed escludere una correlazione tra forma clinica e fenotipo cardio-respiratorio che nella nostra casistica risulta assente.

BIBLIOGRAFIA

- ARIANI F, et al. (2008), *FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome*, in "Am J Hum Genet", 83 (1), 89-93.
- FUKUDA T, et al. (2005), *Methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) variations in Japanese patients with Rett syndrome: pathological mutations and polymorphisms*, in "BrainDev", 27, 211-217.
- GOUTIERES F, et al. (1986), *Atypical forms of Rett syndrome*, in "Am J Med Genet Suppl", 1, 183-94.
- HAGBERG B. A. et al. (1994), *Rett variants: a suggested model for inclusion criteria*, in "Pediatr Neurol", 11, 5-11.
- HUPPKE P. et al. (2000), *Rett Syndrome: analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients*, in "Human Molecular Genetics", vol. 9, 9, 1369-1375.
- POZZI M. C. (2003), *Clinical and epidemiological aspects in a Brazilian institution*, "Arq neuropsiquiatr", 61 (4), 909-915.
- ROLANDO S. (1985), *Rett Syndrome: report of eight cases*, in "Brain Dev", 7, 290-296.
- WAHLSTROM J. et al. (1999), *Congenital variant Rett syndrome in a girl with terminal deletion of chromosome 3p.*, in "J Med Genet", 36, 343-345.