

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO



Facoltà di Medicina e Chirurgia

SCUOLA DI DOTTORATO

Scienze fisiopatologiche, neuropsicobiologiche e
assistenziali del ciclo della vita.
ciclo XXVIII

Tesi di Dottorato di Ricerca

**MALATTIA DI HUNTINGTON AD ESORDIO TARDIVO:
ENTITA' CLINICA DISTINTA?**

Settore Scientifico Disciplinare - Med 26

Dottorando:
Dr.ssa Elisa Capiluppi
R09956

TUTOR : Chiar.mo Prof. Claudio MARIANI
DIRETTORE DELLA SCUOLA: Chiar.mo Prof. Roberto L. WEINSTEIN

Anno Accademico
2014/2015

INDICE

Parte I

INTRODUZIONE

- La Malattia di Huntington 4
- L'esordio di malattia 7
- L'esordio tardivo di malattia 10
- Le scale di valutazione 13

CARATTERISTICHE GENETICHE

- Il gene IT-15 15

PATOGENESI

- Il misfolding proteico 17
- Gain of Function 18
- Loss of function e BDNF 20

TERAPIA

- Terapia sintomatica 26
- Terapia genica 28
- Terapia Ristorativi 29
- Terapia neuroprotettiva 30

Parte II

| | |
|------------------------------------|-----------|
| SCOPO DELLA RICERCA | 32 |
| MATERIALE E METODI | 33 |
| DESCRIZIONE DELLA CASISTICA | 34 |
| RISULTATI | 37 |
| DISCUSSIONE | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | 49 |

Parte I

INTRODUZIONE

LA MALATTIA DI HUNTINGTON

La Malattia di Huntington (MH) è una patologia neurodegenerativa ereditaria a trasmissione autosomica dominante, con esordio prevalente nell'età giovane-adulta e che porta all'exitus nell'arco di 15-20 anni.

Il termine corea deriva dal greco 'Choros', danza, e venne coniato da Paracelso nel 1500 per descrivere un particolare tipo di movimento abnorme caratterizzato da scatti improvvisi, involontari, non ritmici che coinvolgono diverse parti del corpo determinando un'andatura particolare, 'danzante' appunto.

Nonostante i movimenti coreici rimangano uno degli elementi più importanti e soprattutto più clamorosi della patologia, l'eterogeneità delle sue manifestazioni cliniche rendono oggi desueta la denominazione 'Corea di Huntington' ed è invece da preferirsi quella di 'Malattia di Huntington' (MH, o HD dall'anglosassone Huntington's Disease).

La Malattia di Huntington ha una prevalenza *media* nella popolazione mondiale di circa 5-7/100.000 abitanti, con oscillazioni che dipendono dall'area presa in esame, dalle differenze etniche e dalla metodologia epidemiologica (Walzer, 2007). Esiste tuttavia un'effettiva diversità di distribuzione della Malattia nelle varie parti del mondo, con valori massimi riscontrati nelle popolazioni Caucasiche europee in cui la prevalenza raggiunge i 5-10/100.000 persone (Harper, 1996), e valori minimi riscontrati in Giappone, dove è stata stimata una prevalenza di 0.5/100.000 (Masuda et al., 1995). In Italia gli studi epidemiologici condotti in differenti aree geografiche prima della disponibilità del test genetico diretto hanno rilevato tassi compresi tra il 2.3/100.000 e il 4.8/100.000 (Frontali et al., 1990; Groppi et al., 1986; Mainini et al., 1982; Squitieri et al., 1989). Un recentissimo lavoro di Squitieri ha stimato la prevalenza della Malattia di Huntington nella sola regione del Molise di 10.85/100.000 (Squitieri et al., 2015). In regione Lombardia, da quanto si evince dal registro lombardo per le malattie rare (ReLMaR), la prevalenza stimata sarebbe di circa 4-5 su 100.000 abitanti.

Prima dell'avvento del test genetico la diagnosi si basava essenzialmente sulla presenza di segni clinici suggestivi associati a familiarità positiva; in tal modo sfuggiva alla diagnosi una parte significativa di pazienti con forme apparentemente sporadiche o con sintomi atipici o, ancora, con esordi di malattia molto tardivi. La possibilità di eseguire il test genetico e quindi formulare una

diagnosi sicura ha quindi modificato l'epidemiologia della malattia stessa, quasi raddoppiandone la prevalenza (*Harper, 1996*).

La Malattia di Huntington si manifesta classicamente con sintomi motori, decadimento cognitivo progressivo e manifestazioni psichiatriche.

Le **ipercinesie coreiche** rappresentano il sintomo motorio tipico e sono rappresentate da movimenti involontari, afinalistici, relativamente rapidi, irregolari, ricorrenti, imprevedibili e non ritmici, del tronco, della faccia e degli arti. Scompaiono con il sonno, si attenuano con il riposo e vengono accentuate dall'esecuzione di un compito complesso e dallo stress. Nelle fasi iniziali della malattia, le ipercinesie possono manifestarsi con ***tics***, movimenti ripetitivi altamente stereotipati, o con ***jerky movements***, movimenti incontrollati involontari, simili a scatti, che disturbano i normali movimenti o la postura.

Nelle prime fasi della malattia tali movimenti afinalistici si possono presentare in forma lieve mascherandosi quasi con un'accentuazione del "bisogno di muoversi" o con uno stato di irrequietezza, evidenziabile solo quando il soggetto appare particolarmente stressato o quando venga incaricato di svolgere un compito complesso. Con il progredire della malattia invece i movimenti involontari si fanno più pronunciati e il paziente cerca di incorporarli in movimenti semi-finalizzati ("***paracinesie***"); infine tali movimenti appaiono invincibili e aumentano in frequenza, distribuzione e ampiezza, assumendo a volte aspetti ballistici.

Il coinvolgimento del collo, del volto (***grimacès***) e dei muscoli faringei, può causare difficoltà di linguaggio (***disartria***) e nella deglutizione (***disfagia***), mentre la produzione di suoni gutturali è dovuta all'incordinazione tra la muscolatura diaframmatica e la glottide.

Oltre alla corea sono presenti spesso ***atassia*** e ***instabilità posturale*** che portano ad un peggioramento della capacità funzionale del paziente con frequenti cadute, ***impersistenza motoria***, e ***alterazioni della motilità oculare*** con deficit sia della fissazione che dei movimenti saccadici

Nella MH sono molto frequenti anche alterazioni motorie ipocinetiche: ***bradicinesia***, ***distonia***, ***rigidità muscolare*** di tipo plastico e ***mioclono d'azione***. Tali manifestazioni risultano essere più frequenti nelle forme giovanili di malattia (Variante rigida di Westphal).

Se le ***modificazioni della personalità*** rappresentano il disturbo più frequente nei pazienti (72%), i ***disturbi dell'umore*** sono altamente rappresentati e presenti nel 30-50% dei pazienti nel corso della malattia (*Schiwach et al., 1994*). I soggetti con deflessione del tono dell'umore manifestano sensi di colpa, tristezza, anedonia, pensieri suicidari, sintomi che spesso sono associati a difficoltà di concentrazione, diminuzione della libido, sonnolenza eccessiva e rallentamento psicomotorio. Il tasso di ***suicidio*** è 4-6 volte maggiore nei pazienti MH rispetto alla popolazione generale. Già nella descrizione di Huntington era stata sottolineata la tendenza al suicidio ed oggi si

stima che sia presente, nella popolazione HD, un rischio suicidario pari al 5-10% (Walker, 2007).

Sebbene la depressione sia la più comune diagnosi psichiatrica nella MH, un numero minore di pazienti presenta fenomeni di **maniacoalità**; alcuni di esse possono mostrare un quadro tipico di **disturbo bipolare**. Tra i disturbi di ansia il **Disturbo Ossessivo Compulsivo** (DOC) è stato documentato nella MH. Una review effettuata su 11 studi riguardanti pazienti HD ha dimostrato una frequenza di **psicosi** dal 3% al 12% (Mendez, 1994). Le manifestazioni psicotiche includono sintomi paranoidei, deliri e stati psicotici che rassomigliano a vari tipi di schizofrenia.

I **sintomi comportamentali**, che vanno dall'irritabilità e dall'aggressività agli scoppi intermittenti di rabbia sono stati documentati nella MH (Mendez, 1994), rappresentando una causa comune di ospedalizzazione psichiatrica (Dewhurst et al., 1970). L'apatia, spesso secondaria alla depressione o all'uso di farmaci antipsicotici, è documentata come parte del cambiamento di personalità che si manifesta durante la progressione della malattia e si può manifestare con ritiro sociale, diminuzione di iniziativa e non curanza dell'igiene e dell'aspetto (Mendez, 1994).

Frequenti sono i **disturbi da abuso** di sostanze, soprattutto di alcolici e di caffeina, ma anche di farmaci e sostanza psicoattive, i **disturbi della sfera alimentare** (la bulimia e l'anoressia) e i **disturbi della sfera sessuale** (ipersessualità e parafilie).

Il **deficit cognitivo** della MH configura un quadro di demenza sottocorticale con evidente compromissione delle funzioni esecutive ed attentive e con un quadro psico-comportamentale in cui predominano l'alterazione della personalità, dell'emotività, delle condotte sociali e interpersonali. La sindrome disesecutiva si manifesta con deficit di ragionamento (in particolare nel ragionamento logico-deduttivo e ipotetico), nello shifting (ossia la mancanza di flessibilità di pensiero e nell'uso di strategie) con tendenza alla perseverazione, deficit nell'astrazione con tendenza al pensiero concreto e difficoltà a generalizzare, alterazione nella programmazione con conseguente difficoltà nella pianificazione e incapacità nella scelta e nell'uso di strategie adeguate alla soluzione di problemi e nell'attenzione. Le capacità di linguaggio sono relativamente conservate fino agli stadi tardivi di malattia ma possono tuttavia essere presenti alcune alterazioni come il mutacismo, l'inerzia verbale, l'ecolalia, la presenza di parafasie verbali, anomia, perdita della struttura sintattica. Un'altra caratteristica della MH è la mancanza o la relativa scarsità di consapevolezza di malattia (insight di malattia).

Altri sintomi meno comuni possono essere alterazioni del **senso dell'olfatto** (Hamilton JM et al, 1999), **disfunzione autonoma** (Kobal J. et al, 2004), **disturbi del sonno** (Wiegand et al., 1991) e **perdita di peso** che avviene nonostante un adeguato apporto nutrizionale o addirittura con un aumento dell'apporto calorico (Morales et al., 1989). Da un lato ciò è spiegato dal consumo energetico imposto dall'iperkinesia coreica, dall'altro è ipotizzato uno squilibrio tra i neuropeptidi a

livello ipotalami che alterano il bilancio energetico. Il calo ponderale è un fattore prognostico negativo nel decorso della MH.

L'ESORDIO DI MALATTIA

Per convenzione internazionale si è definito l'esordio di malattia come il momento in cui compaiono i sintomi motori, tipici (ipercinesie coreiche) o atipici, anche se la malattia può manifestarsi anni prima con sintomi psico-cognitivi.

Uno studio eseguito nel 1993 da Di Maio e Squitieri (*Di Maio e Squitieri, 1993*) che analizzava tramite un questionario i sintomi di esordio in una popolazione di 510 pazienti, ha messo in luce che il 59% dei soggetti esordisce con un sintomo motorio, ma ben il 23% con un sintomo psichico-cognitivo e il 18% con entrambi. Tra i sintomi motori predominava la corea, ma in una piccola percentuale il sintomo d'esordio era costituito da difficoltà nella deambulazione, perdita di equilibrio, instabilità, difficoltà di eloquio e difficoltà nell'afferrare oggetti. I sintomi psichici erano rappresentati principalmente dalla depressione, ma anche dalla perdita di interessi, dalla difficoltà di relazione, dalla paranoia, da allucinazioni o da declino cognitivo. Questi dati sono in linea con lavori precedenti (*Hayden, 1981; Conneally, 1984*).

Dallo studio di *Squitieri et al.* del 2000 è emerso che il 92% dei pazienti aveva presentato un esordio di malattia tipico, mentre i restanti pazienti un esordio atipico caratterizzato da parkinsonismo (*variante rigida di Westphal* o *Akinesia non rigid variant*), da disturbi di tipo atassico (*Ataxia variant*) o da distonia (*Dystonic Variant*).

Inoltre in questo studio è stato dimostrato che nel gruppo di soggetti HD con esordio motorio atipico, la media del numero di triplette CAG era significativamente più elevato rispetto al gruppo di controllo (55.1 ± 14 con range 42-90 rispetto a 45.4 ± 4 con range 39-66, Mann-Whitney U-test $p=0.0015$) e che i soggetti con manifestazioni di esordio atipiche avevano anche un'età di esordio significativamente più bassa rispetto al gruppo di controllo (27.7 ± 12 range 8-52 contro 42.3 ± 12 range 13-71, T-student test $p<0,0001$).

Come visto la Malattia di Huntington può insorgere sotto i 20 anni (Early Onset), in un range di età "classico" tra i 20 e i 59 anni (Classic Onset) e infine tardivamente, ossia dopo i 60 anni (Late Onset). Il fattore più importante che condiziona l'età di esordio è il numero di triplette CAG espanso con una correlazione inversamente proporzionale tra il numero di triplette e l'età di esordio (ossia più è alta l'espansione più è precoce l'esordio di malattia) (Fig 1).

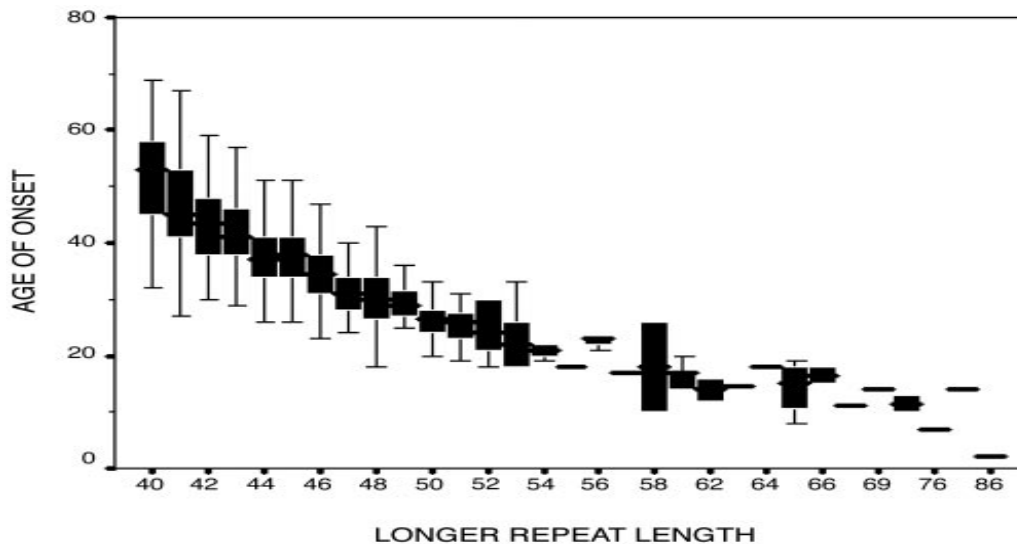


FIG.1: *Tratta da “The U.S.-Venezuela Collaborative Research Project, Wexler et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 3498-3503”*

In realtà la correlazione è lineare solo per le espansioni molto ampie, mentre per espansioni intermedie (40-46 CAG) la forbice si allarga essendo possibile sia un esordio classico che uno Late Onset; nel complesso il numero di ripetute rende conto di circa il 66% nella varianza dell'età di esordio (Myers, 2004).

Per tale motivo si è cercato di individuare, a livello genetico, dei loci all'interno del gene stesso (Djousse and Myers, 2004), di geni limitrofi (Brahim et al., 2014) o fattori ambientali (Simonin et al, 2013) che potessero in qualche modo modificare l'età di esordio. Molti geni sono stati imputati come possibili modificatori, come il genotipo dell'ApoE (Kehoe et al. , 1999), del BDNF (Egan et al. , 2003; Chen et al. , 2004), il polimorfismo del gene GIRK2 per il recettore GluR6 del glutammato (Mac Donald et al. , 1999), il polimorfismo NR2A e NR2B del recettore NMDA (Arning et al., 2008), la proteina HAP1 (Metzger et al. , 2008), il gene UHC-L1 che codifica per l'ubiquitina idrossi-carbossilasi (Naze et al., 2002), e più recentemente il recettore per i cannabinoidi CNR1 (Kloster et al., 2013), il gene promotore NPY e NPY2R (Kloster et al 2014), il gene regolatore PGC 1a (Weydt et al., 2014). Nessuno di questi studi ha individuato comunque sicuri fattori genetici o ambientali modificanti l'età di esordio. Esistono attualmente modelli statistici in grado di predire con discreta precisione l'età di insorgenza di malattia considerando il numero di triplette CAG, l'età del paziente, il tipo di ereditarietà, l'età di insorgenza di malattia del genitore (Langbehn et al, 2010).

Quando la MH insorge al di sotto dei 20 anni viene riconosciuta come “ Malattia di Huntington Giovanile” e rappresenta circa il 5-7% di tutti i casi di MH (Nance and Myers, 2001).

La **forma giovanile** è correlata ad un elevato numero di triplette CAG ripetute, generalmente oltre 60 (*Squitieri et al.*, 2005), mentre espansioni al di sopra di 80-100 ripetute causano una **forma infantile** di malattia che oltre al fenotipo rigido si manifesta anche con problemi di apprendimento, distonia ed epilessia (*Cannella et al.*, 2004). Nel 70-80% dei casi infanto-giovanili la trasmissione avviene per via paterna (*Hayden*, 1981; *Harper*, 1991). A livello clinico le forme giovanili esordiscono spesso con la variante rigida di Westphal, con importanti disturbi psico-comportamentali e con ritardo mentale. Caratteristiche di esordio più tipiche della variante infantile, sono l'autismo, l'epilessia, le mioclonie, i disturbi cerebellari, i disturbi dell'apprendimento, le anomalie elettroencefalografiche, la spasticità (*Squitieri et al.*, 2005).

Quando la MH insorge tra i 20 e i 50 anni, caratteristicamente tra i 35 e i 45 anni, si manifesta nella forma classica di malattia caratterizzata dalla triade sintomatologia di disturbo del movimento, prevalentemente con ipercinesie coreiche, decadimento cognitivo e sintomi psichiatrici. L'inizio conclamato della malattia è preceduto da una fase *presintomatica* che comprende gli anni di assenza completa di malattia e una fase definita *prediagnostica* in cui i pazienti mostrano sottili modificazioni della personalità, della sfera cognitiva e del controllo motorio. Il decorso della malattia è progressivamente ingravescente senza remissioni e porta a morte nell'arco di circa 15-20 anni dall'esordio.

Vi sono discordanze rispetto alla correlazione tra sopravvivenza, età di esordio di malattia e numero di triplette CAG ripetute. Van Dijk e collaboratori (*Van Dijk et al.*, 1986) hanno osservato che le forme ad esordio giovanile mostrano una sopravvivenza minore di quelle esordite in età adulta; secondo uno studio di Kiebert (*Kiebert et al.*, 1994), non sembra esistere una stretta correlazione tra sopravvivenza e numero di triplette CAG; questo dato è stato confermato in un lavoro di Squitieri (*Squitieri et al.*, 2002), in cui una correlazione tra il numero di triplette e la progressione di malattia è stato dimostrato solo per le espansioni molto ampie. In contrasto un recente lavoro di Ravina (*Ravina et al.*, 2008) evidenzia un'associazione tra numero di triplette e declino motorio, cognitivo e delle capacità funzionali globali.

Marder K. e collaboratori (2000) hanno valutato il tasso medio di progressione in un' ampia popolazione di pazienti. Secondo questo lavoro il tasso di progressione medio della malattia è pari alla perdita di 0.72 unità TFC (Total Functional Capacity)/anno (SE 0.04), con una variabilità dipendente dal valore di TFC al momento della valutazione. Per una TFC compresa tra 7 e 13 (minore compromissione funzionale), la media del tasso di progressione è 0.97/anno (SE 0.06), per una TFC tra 3 e 6 è 0.38/anno (SE 0.08), infine per una TFC tra 0 e 2 (grave compromissione funzionale) è 0.06/anno (SE 0.1); quindi, la progressione è più rapida quando è minore la compromissione funzionale e più lenta nelle gravi compromissioni.

L'ESORDIO TARDIVO DI MALATTIA

Quando la malattia esordisce dopo i 50 anni (*Britton 1995*) o secondo i più recenti dati di letteratura (*James et al., 1994, Lipe et Bird 2008, Koutsis et al 2014, Cornejo-Olivas et al 2015*) dopo i 60 anni, si parla di esordio tardivo di malattia (Late Onset: LO). Pochi lavori hanno esaminato le caratteristiche cliniche e genetiche degli esordi tardivi di malattia. Secondo gli studi epidemiologici effettuati prima dell'avvento del test genetico, circa il 10-25% dei soggetti con MH presenta un esordio tardivo di malattia (*Hayden MR, 1981; Harper PS, 1991*). Questi ed altri lavori, inoltre, hanno sottolineato che i soggetti con esordio tardivo mostrerebbero una progressione di malattia più lenta, spesso con sintomi coreici lievi e almeno inizialmente un minor declino cognitivo (*Hayden MR, 1981; Harper PS, 1991; Myers et al., 1985; Faught et al., 1983*). Altri lavori, sempre effettuati prima della scoperta del gene causale (*Myers et al., 1983; Farrer et al., 1985*), hanno ipotizzato una preponderanza di trasmissione materna nei soggetti con forma LO, mentre altri Autori (*Went et al., 1984; Adams, 1986*) non hanno confermato questa ipotesi.

Un primo lavoro specifico su pazienti LO è stato pubblicato da *Myers et al. 1985*, prima della scoperta del gene IT-15 e prima dell'uso della scala di valutazione specifica UHDRS. In questo lavoro sono stati studiati 25 soggetti LO con una media di età di esordio di malattia di 57.5 anni e un'età media alla diagnosi di 63.1 anni. In questa casistica vi era una preponderanza nella trasmissione materna. Tutti i 25 pazienti presentavano modesta corea e ipotonia, 18 mostravano disturbi della deambulazione e 15 disfagia. Tutti i pazienti mostravano una compromissione a livello cognitivo e la depressione, spesso correlata ad ansia, era frequentemente presente negli stadi precoci ed era negativamente correlata con la durata di malattia. La disabilità era valutata con la scala 'Disability rating' (media della Physical Disability e dell'Independence Scale) con un punteggio medio di 64.4/100. Per la maggior parte dei pazienti il valore si è mantenuto stabile per molti anni, indicando una lenta progressione. Le neuroimmagini, quando rilevate, mostrarono nei pazienti testati atrofia del caudato.

Secondo gli autori di questo articolo le manifestazioni cliniche della MH ad insorgenza tardiva sono simili a quelle dell'età classica, ad eccezione del fatto che la malattia mostra una progressione più lenta ed una minore disabilità funzionale. In particolare i sintomi mostrano una fase di plateau o progrediscono molto lentamente. I sintomi più comuni nei pazienti osservati erano una modesta corea associata a disturbi cognitivi (100%), la disartria (88%), i disturbi della deambulazione (72%).

Un secondo lavoro di *Kremer et al. 1993* si è focalizzato sulle caratteristiche genetiche dei pazienti con esordio tardivo, considerando l'esordio sopra i 50 anni di età. In questo studio sono stati studiati 137 pazienti con diagnosi clinica di MH ad esordio tardivo. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a conferma genetica di malattia; 133 di essi sono risultati positivi per un'espansione nel

range patologico, mentre i restanti 4, pur avendo una clinica compatibile con MH, sono risultati negativi. Due di essi avevano familiarità positiva, e potrebbero rappresentare una fenocopia di MH. La media del numero di ripetute CAG era di 42 (range 38-48).

Una significativa correlazione negativa ($r = -0,29$) è stata evidenziata tra il numero di triplette CAG e l'età di esordio di malattia sul totale della coorte di pazienti mentre, analizzando solamente i pazienti con età ≥ 60 anni, non è stata evidenziata alcuna correlazione. Inoltre non è stata evidenziata alcuna correlazione neppure tra l'età di esordio e il numero di ripetute CAG nell'allele minore e con il genere dei genitori o dei nonni. Non vi era in questa popolazione ad esordio tardivo una preponderanza nella trasmissione materna. Questo studio ha evidenziato che la variazione nel numero di ripetute CAG rende conto solo del 7% nella variazione dell'età di esordio per i soggetti sopra i 50 anni e mostra chiaramente come con l'aumento dell'età di esordio l'effetto della lunghezza della ripetizione abbia meno influenza sull'età di esordio. In particolare al di sopra dei 60 anni di età non vi è alcuna correlazione con il numero di triplette CAG. Un altro punto evidenziato è che esisterebbe per i casi LO un'aggregazione familiare riguardo l'età di esordio, facendo ipotizzare che altri fattori di origine genetica o ambientale potrebbero influire su di essa.

Un altro lavoro è stato condotto da *James et al., 1994* retrospettivamente su 33 pazienti LO, 13 maschi e 20 femmine, con esordio di malattia superiore a 60 anni (media 65 anni, range 60-77), registrati nelle città di Mid Glamorgan, South Glamorgan e Gwent (South East Wales). Secondo questo registro la prevalenza dei soggetti MH con esordio in età ≥ 60 anni è del 4.7%. La mediana dell'età di durata di malattia era di 13 anni (range 0.5-25 anni) con una sopravvivenza fino a 86 anni di età. Nove pazienti al momento della rilevazione erano ancora viventi (età mediana 80 anni) e il range della loro durata di malattia era di 0.5-24 anni. I rimanenti 24 casi erano deceduti; la mediana dell'età di esordio era di 62.5 anni (range 60-72). L'età del decesso era compresa tra 63 e 86 anni (mediana 76 anni), con una durata di malattia compresa tra 1 e 25 anni (mediana 13 anni). In 32 soggetti vi era familiarità per MH, nell'altro caso si è ottenuta una conferma autoptica di malattia. L'analisi genetica molecolare è stata possibile solo in 10 pazienti e in tutti è risultata positiva per l'espansione CAG con una media di 38.6 (range tra 36 e 38). I sintomi di esordio erano rappresentati da disturbi del movimento in 32 casi, mentre in un solo caso erano presenti disturbi psichiatrici precedenti l'esordio motorio. I disturbi del movimento erano rappresentati da: disturbi della deambulazione in 32 soggetti; movimenti involontari in 31 soggetti (corea); disartria in 20 casi; disturbi della deglutizione in 2 casi e rigidità in uno. Sintomi psichiatrici erano evidenti in 16 pazienti (48%): irritabilità e aggressione in 11 casi, depressione in 6 casi, e 3 di essi tentarono suicidio. Sintomi ansiosi erano presenti in un soggetto, disturbi del sonno in un altro, paranoia in 2 casi.

Circa un terzo dei pazienti (n=10) presentava sintomi correlati a declino delle funzioni cognitive; 8 di essi avevano disturbi della memoria e 7 scarsa concentrazione; solo un paziente, che mostrava sia difficoltà di memoria sia scarsa concentrazione, aveva difficoltà di linguaggio.

Solo una paziente, come descritto sopra, aveva avuto una iniziale presentazione clinica psichiatrica. Al momento della prima osservazione medica il 58% dei pazienti viveva da solo, il 33% in famiglia e il 12% era istituzionalizzato.

Questo studio ha evidenziato che la MH si manifesta nei soggetti LO più anziani (≥ 60 anni) principalmente con disturbi motori, corea in particolare, con scarsa disabilità e con una prognosi positiva sia riguardo l'aspettativa di vita (eccezione fatta per cause intercorrenti di malattia diverse dalla MH), sia riguardo la funzionalità globale del soggetto e la sua indipendenza. Queste caratteristiche cliniche possono giustificare la sottostima dei soggetti con MH in questa fascia di età, documentata tra l'altro dal fatto che solo il 10% dei pazienti si è rivolto al neurologo per la percezione dei propri disturbi.

Un lavoro di *Britton et al. 1995* ha individuato una variante fenotipica di Malattia di Huntington caratterizzata da esordio tardivo e assenza di decadimento cognitivo. In questo report sono analizzati 5 pazienti e raccolte informazioni su altri 6 pazienti provenienti da due differenti famiglie non imparentate. In tutti i pazienti età di esordio è stata oltre i 50 anni di età e il disturbo del movimento è divenuto disabilitante in circa 15 anni; il decadimento cognitivo era assente o minimo. Neurologi esperti in disturbi del movimento avevano diagnosticato questi pazienti come non affetti da MH ma da un'altra forma di corea ereditaria. In realtà l'analisi genetica ha mostrato in tutti i casi un'espansione di triplette CAG in un range tra 44 e 46 ripetute.

Nel 2008 *Lipe e Bird* hanno descritto una casistica di 34 pazienti affetti da MH con esordio tardivo (tra i 60 e i 79 anni). Il range di espansione di triplette variava da 38 a 44 ripetute, con una significativa correlazione negativa tra età di esordio e numero di ripetute ($r = -0.421$). Le caratteristiche principali del gruppo in esame erano : 1) il 68% dei pazienti erano i primi della famiglia ad essere diagnosticati (apparente non familiarità per HD); 2) i sintomi motori erano i sintomi di esordio nella maggior parte dei casi; 3) la disabilità variava da lieve a severa; 4) la durata di malattia era di circa 12 anni, ossia minore di quanto descritto per le forme ad esordio classico; 5) la causa di morte non era in genere correlata alla malattia coreica ma alle normali cause di morte per età (tumori e malattie cerebro-cardiovascolari); 7) la demenza era talora associata e correlata a malattia di Alzheimer.

Gli autori inoltre hanno cercato di identificare tre quadri clinici ("vignettes") di forme di malattia ad esordio tardivo: un primo quadro descriveva un paziente con esordio a 89 anni, con un basso score all'UHDRS motorio, assenza di disturbi psichiatrici e cognitivi e completa indipendenza fino al

decesso; l'analisi genetica ha mostrato un CAG espanso di 39; il secondo quadro descriveva un paziente con esordio motorio associato a disturbi di personalità a 61 anni ed una prima osservazione clinica a 68 anni in cui si evidenziava uno score motorio di 39, un disturbo comportamentale caratterizzato da alterazioni dell'umore con irritabilità con aggressività verbale e con un declino cognitivo intorno ai 70 anni; l'analisi genetica mostrava un' espansione di 41 CAG; rispetto al precedente quadro clinico la disabilità era correlata soprattutto ai disturbi comportamentali e psichiatrici. Il terzo quadro clinico infine mostrava un paziente con malattia severa con esordio a 61 con lieve corea, deficit mnesici e disturbi di ansia all'età di 60 anni. L'analisi del DNA ha evidenziato un'espansione di 43 CAG. Negli anni successivi l'esordio il paziente è stato ricoverato per disturbo psicotico con allucinazioni e deliri. Dopo 4 anni la TFC è passata dallo score di 7 alla score di 2 e l'indipendenza scale da 80 a 65; il disturbo motorio era incrementato da 45 a 61 ma era meno evidente il disturbo coreico e più pronunciata la distonia e il parkinsonismo.

Koutsis et al nel 2014 ha pubblicato uno studio in cui venivano studiate le caratteristiche cliniche di 41 soggetti con esordio tardivo di malattia (>60 anni) che sono stati poi confrontati con un gruppo di 39 soggetti con sintomi riconducibili alla malattia ma con test genetico negativo e con 290 pazienti con test genetico positivo e un esordio classico di malattia. In tale studio non sono state trovate differenze statisticamente significative confrontando i due gruppi di pazienti con il gruppo LO; in particolare non è stata confermata la benignità della forma late onset sia in termini di modalità di esordio che di evoluzione.

Un recente studio di coorte di *Cornejo-Olivas et al (2015)*, ha analizzato le caratteristiche genetiche di un gruppo di pazienti affetti da esordio tardivo di malattia (media di esordio 64.1 ± 4.2) con un'espansione media di CAG di 42.5 ± 2.5 . In tale studio sono stati arruolati 329 pazienti con malattia di Huntington; il 9.42% del totale rappresentavano quelli con esordio tardivo. Le manifestazioni coreiche e il disturbo cognitivo rappresentavano i sintomi più frequenti associati alla forma tardiva; inoltre i pazienti affetti dalla forma tardiva sembravano avere una forma più lieve di malattia come già precedentemente descritto e una maggior assenza di familiarità.

LE SCALE DI VALUTAZIONE

Per valutare il paziente secondo parametri clinici standardizzati e riconosciuti a livello internazionale viene utilizzata l'**UHDRS** (Unified Huntington's Disease Rating Scale), ideata e validata nel 1996 dall' "Huntington Study Group" (*Huntington Study Group, 1996*).

La scala è suddivisa in quattro sezioni: la prima valuta l'aspetto motorio (Motor assessment), la seconda l'aspetto cognitivo (Cognitive assessment), la terza l'aspetto

comportamentale (Behaviour assessment), mentre nell'ultima sezione vengono valutate le capacità funzionali.

L'UHDRS I (Motor Assessment) valuta 16 *items* e a ciascuno di essi è assegnato un punteggio da 0 a 4; i primi sei items valutano la motilità oculare, i movimenti volontari, la rigidità, la deambulazione, la stabilità posturale e l'equilibrio, i movimenti coreici e la distonia. Per questi ultimi due parametri viene attribuito un punteggio che rispecchia sia la gravità sia la frequenza del sintomo (0 = assente; 1 = scarsa/saltuaria; 2 = lieve/frequente o moderata/saltuaria; 3 = moderata/frequente; 4 = grave/continua e prolungata). Per la corea vengono esaminate 7 regioni corporee (faccia, regione oro-bucco-linguale, arto superiore destro, arto superiore sinistro, tronco, arto inferiore destro, arto inferiore sinistro), per la distonia 5 sezioni (arto superiore destro e sinistro, arto inferiore destro e sinistro, tronco). Infine l'ultimo punto assegna un valore da 0 a 4, a seconda che sia improbabile (0 punti) o certa (4 punti) la diagnosi di MH. Lo score per questa sezione può dunque variare da 0 fino a 128 punti.

L'UHDRS II (Cognitive Assessment) valuta le capacità cognitive utilizzando i seguenti tests neuropsicologici :

- Symbol digit test
- Test fluenze verbali per categoria semantica e per lettera
- Stroop test (denominazione colori, lettura delle parole, interferenze)

Particolarmente nelle fasi avanzate di malattia può risultare impossibile somministrare tale valutazione testistica.

L'UHDRS III (Behaviour assessment) valuta i seguenti aspetti: depressione, sensi di colpa, ansia, pensieri suicidari, comportamento irritabile, comportamento compulsivo, comportamento ossessivo, atteggiamento distruttivo, i deliri, le allucinazioni e l'apatia. Per ciascuno dei seguenti elementi viene valutata sia la frequenza sia la gravità, in modo che per ciascun *item* può essere assegnato un valore compreso tra 0 e 8, per uno score massimo di 88 punti. Nella parte finale si aggiunge un altro punteggio per ciascuna delle seguenti voci: assenza/presenza di confusione, assenza/presenza di demenza, assenza/presenza di depressione, necessità o meno di terapia antidepressiva, necessità o meno di terapia per l'aggressività, secondo il parere dell'esaminatore.

L'UHDRS IV effettua una dettagliata valutazione funzionale mediante 3 scale : 1) le principali occupazioni lavorative e domestiche vengono analizzate mediante la 'Functional assessment scale' con un range di punteggi da 0 (nessuna attività) a 25(normale), 2) una valutazione di disabilità globale mediante la 'Disability scale' con un range di punteggi da 0 (totalmente dipendente) a 100 (normale) e 3) una valutazione sulla capacità funzionale totale mediante la 'Total Functional Capacity scale' con un range di punteggi da 0 (totalmente incapace) a 13(normale).

Quest' ultima scala di valutazione (**TFC**) (*Shoulson*, 1981) permettere in modo rapido di effettuare una rilevazione della gravità di malattia. Sono valutate infatti le capacità del soggetto di svolgere il proprio lavoro (range 0-3), di occuparsi delle finanze (range 0-3) e delle faccende domestiche (range 0-2), viene valutata la ADL (Activities of Daily Living, attività quotidiane) (range 0-3), e infine il care level (range 0-2), per un valore complessivo che può andare da 0 a 13 .

A partire dal valore della TFC, secondo Shoulson e Fahn (*Shoulson e Fahn*, 1979), può essere ricavato lo stadio di malattia: uno score da 13 a 11 indica lo stadio I di malattia (lieve o iniziale), da 10 a 7 lo stadio II, da 6 a 3 lo stadio III, da 2 a 1 lo stadio IV e uno score di 0 corrisponde allo stadio V.

CARATTERISTICHE GENETICHE

IL GENE IT-15

La MH viene trasmessa come carattere autosomico dominante; nel 1983 Gusella e collaboratori (*Gusella et al.*, 1983) identificarono il locus genico sul cromosoma 4 e dieci anni dopo fu mappato sul braccio corto del cromosoma 4 (4p16.3) il gene responsabile della malattia (*Huntington's Disease Collaborative Research Group*, 1993).

Il gene, denominato IT-15, contiene 67 esoni e a livello dell'esone 1 contiene un segmento polimorfico in cui è presente la ripetizione del trinucleotide CAG (citosina- adenina- guanina) inferiore a 27 nella popolazione sana. Questo segmento genico codifica per una proteina di 350 kDa, denominata '*Huntingtina*', che contiene nel segmento N-terminale un residuo polimorfico di glutamina. La mutazione genica consiste nell'espansione della tripletta citosina-adenina-guanina superiore a 35 (poliQ), che porta alla formazione di Huntingtina mutata (*mu hht*).

Dalla genetica molecolare sono stati spiegati tre aspetti clinici importanti: l'*anticipazione generazionale*, la *penetranza incompleta* e l'esistenza di *alleli intermedi*.

Il fenomeno *dell'anticipazione generazionale* è rappresentato dall'esordio più precoce della patologia nelle generazioni successive, osservato soprattutto quando la malattia viene ereditata per via paterna. La base genetica di tale fenomeno ha trovato esauriente spiegazione nella scoperta di mutazioni instabili. Nella MH il range della ripetizione della tripletta CAG, pur rimanendo sempre superiore a 36, varia di generazione in generazione, a causa dell' instabilità meiotica, comune nell'allele patologico e invece molto infrequente (<1%) negli alleli non patologici. A seguito di tale instabilità il numero di ripetizioni della tripletta può aumentare, o più raramente, diminuire durante la meiosi, portando ad un diverso numero di ripetizioni; questo fenomeno è più frequente durante la

spermatogenesi rispetto all'oogenesi e ciò spiega la maggior frequenza del fenomeno dell'anticipazione quando la malattia è trasmessa per via paterna. Nella popolazione, il gene è polimorfico e instabile: alleli con 27-35 CAG sono considerati 'intermedi' in quanto il portatore di tali espansioni non svilupperà la malattia ma, per instabilità meiotica, potrà trasmettere un allele patologico (nuova mutazione). Alleli con 36-39 CAG sono sicuramente patologici, ma con una ridotta penetranza; soggetti con un allele in questo intervallo svilupperanno la malattia molto tardivamente. Alleli con $CAG \geq 40$ sono invariabilmente associati allo sviluppo di malattia.

La *penetranza incompleta* è determinata dal fatto che nel range di espansioni comprese tra 36 e 39, la malattia può manifestarsi in età talmente avanzata da divenire clinicamente irrilevante. Comprendere la frequenza con cui questi alleli causano malattia non è possibile in quanto molte delle osservazioni riguardano esclusivamente soggetti che hanno sviluppato MH.

Molti casi sporadici sono dovuti all'esistenza di alleli mutati "intermedi", ossia nel range compreso tra 27 e 35, non patologici, ma suscettibili di mutazioni nelle successive generazioni. Uno studio del New England Huntington's Disease Research Center Without Walls (Boston), effettuato su una popolazione di 1260 soggetti con familiarità per MH, ha mostrato una frequenza degli alleli intermedi pari a circa il 3.2% di tutte le mutazioni. In realtà poiché poche di queste mutazioni sono state osservate e la loro frequenza nei campioni non MH non è stata ben stabilita, la frequenza con cui queste mutazioni occorrono rimane difficile da stabilire. Una stima di circa 6% è stata indicata da alcuni studi (*Chong et al.*, 1997). In base a queste distinzioni l'American College of Medical Genetics Huntington's Disease Working Group ha evidenziato 4 categorie diagnostiche : $CAG < 26$ allele normale, $CAG = 27-35$ allele intermedio, $CAG \geq 36-39$ allele a ridotta penetranza, $CAG \geq 40$ allele patologico.

Al di sopra delle 40 ripetute CAG è stata dimostrata una correlazione inversamente proporzionale tra il numero di CAG e l'età di esordio di malattia. Secondo la casistica di 1165 soggetti riportata da Myers (*Myers*, 2004), la correlazione avrebbe una $r = -0.81$ e spiegherebbe il 66% della varianza nell'età di esordio. In realtà, sebbene sui grandi numeri esista una correlazione abbastanza stretta tra il numero di CAG e l'età di esordio, non è possibile predire l'età di esordio in base all'espansione, ad eccezione dei casi (circa 5%) di esordio giovanile in cui un'espansione molto ampia è correlata all'esordio precoce. Ad esempio, sempre nella casistica di Myers, un'espansione di 44 CAG può dare un'esordio a 31 anni come un'esordio a 66 anni. Ciò dimostra non solo lo scarso potere predittivo del numero di CAG sull'età di esordio, ma anche che la variazione nell'età di esordio non può essere spiegata solo dal numero di ripetute.

La *fitness genetica* (w) del gene mutato IT-15, definita come efficienza riproduttiva del soggetto portatore della mutazione, e quindi capacità di generare figli che a loro volta procreano, è

di circa 1. La spiegazione più plausibile di tale dato risiede nel fatto che la Malattia di Huntington nella forma classica, che rende conto della maggior parte dei casi, esordisce nell'età adulta, quando il soggetto affetto è in piena attività lavorativa e riproduttiva, per cui molti soggetti affetti al momento della diagnosi hanno uno o più figli, i quali hanno una probabilità del 50% di essere affetti loro stessi.

In letteratura sono stati descritti rari casi di pazienti con omozigosi per espansione della tripletta CAG nel gene IT-15 (*Wexler et al., 1987; Myers et al., 1989; Kremer et al., 1994; Durr et al., 1999; Squitieri et al., 2006*).

PATOGENESI

IL MISFOLDING PROTEICO

L'Huntingtina (htt) è una proteina di 350-kDa che contiene un segmento polimorfico che varia da 6 a 35 ripetizioni di glutammine nel dominio N-terminale, a funzione tuttora sconosciuta. L'htt è ampiamente espressa, prevalentemente a livello del SNC (neocorteccia, corteccia cerebellare, striato e ippocampo). All'interno della cellula l'htt si ritrova nel citoplasma, nei neuriti e a livello delle sinapsi ma anche a livello nucleare. Essa è associata a vari organuli e strutture (vescicole ricoperte di clatrina, gli endosomi, i mitocondri, i microtubuli e le membrane plasmatiche). A partire da queste considerazioni, si pensa che l'htt sia coinvolta in numerose funzioni a livello citoplasmatico e del nucleo. Inoltre l'htt interagisce con numerose proteine coinvolte nell'espressione genica, nel trasporto intracellulare, nella trasduzione dei segnali intracellulari e nel metabolismo regolando il trasporto e l'endocitosi [huntingtin-associated protein 1 (HAP1), huntingtin-interacting protein 1 e 14 (HIP1- HIP14), proteina correlata all'HIP1 (HIP1R), protein chinasi C, casein Kinasi substrate in neurons-1 (PACSIN1)].

Infine l'htt è una importante proteina con *funzione anti-apoptotica*. Studi su topi knock-out hanno dimostrato che l'htt è necessaria per il normale sviluppo dell'embrione e per la neuro genesi: topi che non esprimono htt mostrano un'estensiva morte delle cellule dell'ectoderma e muoiono alla settima giornata di vita embrionale (*White et al., 1997*).

L'Huntingtina mutata risulta instabile, soggetta al clivaggio e al ripiegamento in strutture tridimensionali anomale (misfolding proteico), alla degradazione incompleta da parte del sistema proteosoma-ubiquitina e infine alla formazione di inclusioni neuritiche, citoplasmatiche e nucleari, che portano inizialmente alla disfunzione cellulare e infine alla morte neuronale.

Va ricordato che i meccanismi che permettono la corretta conformazione tridimensionale (folding) del peptide neosintetizzato, di cui il gene codifica solo la sequenza aminocidica, dipendono non solo

dalla struttura primaria, ma anche dall'ambiente cellulare e da meccanismi attivi che lo guidano. E' noto che nell'ambiente cellulare molte proteine per essere avvolte correttamente necessitano della presenza di molecole "assistenti", che sono note come "chaperones". Il folding proteico può essere descritto come l'effetto sinergico di due processi, nel primo l'informazione è contenuta nella sequenza primaria della proteina, mentre nel secondo, l'informazione viene acquisita dall'ambiente circostante attraverso l'azione di molecole assistenti ("helper").

Una volta raggiunto un livello critico di concentrazione delle proteine anomale e dei segmenti poliQ solubili inizia il processo di aggregazione definito nucleazione. Il tempo necessario alla nucleazione dei frammenti solubili di hht renderebbe conto della latenza nell'esordio della malattia. Una volta iniziato il processo di nucleazione, i frammenti cellulari si compattano in strutture tridimensionali ripiegate a "β-foglietto". A partire da queste si formano le proto fibrille, successivamente le fibrille e infine i nuclei di aggregazione e le inclusioni visibili microscopicamente.

GAIN OF FUNCTION

Secondo la visione patogenetica definita "*gain of toxicity function*", ossia guadagno di funzione tossica, l'hht mutata e in particolare il suo segmento poliglutamminico (poliQ), interagirebbe in numerosi processi cellulari portando inizialmente ad una disfunzione di questi ultimi e successivamente alla morte cellulare.

Le analisi post-mortem del tessuto cerebrale, proveniente dai pazienti deceduti ai primi stadi di malattia, rivelano la presenza di neuriti distrofici prima che sia avvenuta la morte cellulare (*Sapp et al.*, 1999). Allo stesso modo, nei modelli animali murini, è stato possibile dimostrare alcune alterazioni neuropatologiche, come la disfunzione elettrofisiologica, le alterazioni mitocondriali e la presenza di aggregati negli assoni e nei terminali assonici (*Gutekunst et al.*, 1999; *Hodgson et al.*, 1999; *Li H. et al.*, 2000; *Laforet et al.*, 2001; *Bezprozvanny and Hayden*, 2004). Alcuni studi, inoltre, hanno dimostrato che la disfunzione neuronale potrebbe coinvolgere i recettori dei neurotrasmettitori (*Sapp et al.*, 1999; *Gutekunst et al.*, 1999; *Li H. et al.*, 2000; *Luthi-Carter et al.*, 2000). Infine, è stato dimostrato che, nelle fasi precoci di malattia, l'Huntingtina mutata disregola l'omeostasi mitocondriale; in particolare la disfunzione riguarda il "calcium handling" (*Bezprozvanny and Hayden*, 2004), mentre vengono attivate le proteasi, come la calpaina (*Bizat et al.*, 2003), e infine potrebbe essere incrementata la via p53 (*Bae et al.*, 2005). La disfunzione mitocondriale dovuta alla riduzione dei livelli di ATP, causa a sua volta il rilascio del citocromo c e l'attivazione delle caspasi (*Choo et al.*, 2003). Inoltre la disregolazione del Ca⁺⁺ nei neuroni spinosi potrebbe portare ad un anormale potenziamento dei recettori NMDA e alla sensibilizzazione dei

recettori di tipo 1 per l'inositolo trifosfato localizzato nel reticolo endoplasmatico (*Choo et al.*, 2003). Queste anomalie funzionali giocherebbero un ruolo centrale nella MH e potrebbero spiegare lo stress ossidativo, i processi eccitotossici e le disfunzioni del metabolismo che si osservano nei soggetti affetti. Altri precoci meccanismi che portano alla disfunzione e alla morte cellulare potrebbero coinvolgere la proteina HIP-1, che interagisce in modo anomalo con l'Huntingtina patologica (Huntingtina wild type, hht wt) portando a morte cellulare (*Gervais et al.*, 2002).

Altri elementi chiave nel processo patogenetico sono l'alterazione del trasporto assonale (*Li H. et al.*, 2000), della secrezione e dell'endocitosi. Inoltre l'hht wt associandosi con la proteina HAP1 e, con il complesso proteico contenente dineina/dinactina e Kinesina, stimola il trasporto del BDNF (*Gauthier et al.*, 2004), processo che non può avvenire quando l'htt è mutata. (*Li X.J. et al.*, 1995; *Li S.H. et al.*, 1998; *Gauthier et al.*, 2004). Dunque, negli stadi precoci della MH, la rottura delle interazioni tra la forma solubile dell'htt con la proteina HAP1, altera il ruolo dell'Huntingtina nel trasporto. Negli stadi più avanzati, l'Huntingtina con il residuo poliQ, forma degli aggregati neuritici che contribuiscono al difetto del traffico attraverso il meccanismo del guadagno di funzione.

Il clivaggio proteolitico dell'Huntingtina nei fragmenti N-terminali, contenenti la coda poliQ, e la loro successiva traslocazione nel nucleo è una delle chiavi del processo patogenetico. Infatti la traslocazione nucleare è necessaria per indurre la neurodegenerazione (*Saudou et al.*, 1998), e ci sono evidenze che riducendo il clivaggio diminuisce la tossicità della mu hht e rallenta la progressione della malattia (*Wellington et al.*, 2000). Numerose proteasi clivano l'Huntingtina, sia in vitro che in vivo, e i corrispondenti prodotti di clivaggio sono stati trovati nel cervello di pazienti e nei modelli murini (*Mende-Mueller et al.*, 2001). Queste proteasi includono le caspasi 1, 3, 6, 7 e 8, la calpaina, e aspartil-proteasi. Un'anomala attivazione di queste proteasi potrebbe risultare da vari insulti ricevuti dai neuroni HD come ad esempio un eccessivo livello di Ca^{++} citosolico, il ridotto supporto trofico, o l'attivazione della via dell'apoptosi. Come queste proteasi contribuiscano al processo patologico non è ancora stato chiarito, ma recenti studi suggeriscono che non solo il frammento N-terminale, che risulta dalla proteolisi, sarebbe tossico. Infatti, la mu htt resistente al clivaggio da parte della caspasi- 6, ma non della caspasi-3, non provoca disfunzione neuronale e neurodegenerazione, indicando che la natura della proteasi coinvolta è critica per la progressione del processo (*Graham et al.*, 2006).

Una volta nel nucleo, l'hht poliQ induce la morte cellulare nei neuroni dello striato. Molti studi hanno dimostrato che l'hht poliQ nucleare induce la disregolazione delle vie trascrizionali a livello genico, e in particolare è stata sottolineata la diminuzione della trascrizione del gene per il BDNF (*Zuccato et al.*, 2001; *Cattaneo et al.*, 2005).

Nel nucleo, il frammento N-terminale dell'hht poliQ forma gli aggregati neuronali intranucleari (NIIs); il ruolo dei NIIs è tuttora discusso in quanto la più alta concentrazione di neuroni contenenti NIIs si ritrovano nelle aree cerebrali dove non è presente neurodegenerazione (Gutekunst et al., 1999); inoltre i NIIs non sono correlati con la morte cellulare nei modelli HD *in vivo* e *in vitro* (Saudou et al., 1998; Kim et al., 1999; Slow et al., 2005). La formazione di NIIs potrebbe dunque essere un meccanismo protettivo delle cellule per stoccare momentaneamente i prodotti tossici solubili prima che essi vengano degradati dai proteosomi. In accordo con questa teoria è il fatto che l'inibizione del processo di ubiquitinazione causa la soppressione della formazione degli aggregati ma l'accelerazione della morte cellulare indotta dal frammento poliQ (Saudou et al., 1998). Generalmente l'ubiquitinazione è vista come un sistema composto dal complesso proteosoma-ubiquitina che porta ad una poli-ubiquitinazione dai substrati e alla loro successiva degradazione; essa però può mostrarsi anche come mono-ubiquitinazione o ancora come multipli processi di mono-ubiquitinazioni in differenti tappe. In questo caso, le modificazioni proteiche risultanti potrebbero avere diverse conseguenze, come la promozione della traslocazione nucleare della mu hht all'interno del nucleo (Bae et al., 2006).

In aggiunta al sistema ubiquitina-proteosoma, anche l'**autofagia** regola la formazione di inclusioni, promuovendo la clearance dell'hht mu, mediante la degradazione mediata dai lisosomi (Kegel et al., 2000; Petersen et al., 2001).

LOSS OF FUNCTION E IL BDNF

Una nuova linea di interpretazione nella patogenesi della Malattia di Huntington si è venuta a delineare negli ultimi anni, grazie alla scoperta che il Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) svolge un ruolo fondamentale nella neuroprotezione e grazie alla dimostrazione che sia la sua produzione sia il suo trasporto sono direttamente influenzati dalla presenza o meno della huntingtina normale (wt = wild-type). Secondo questa ipotesi ad una diminuzione dei livelli di huntingtina wt corrisponderebbe una proporzionale diminuzione dei livelli di BDNF, fatto che si traduce in una perdita di funzione neuroprotettiva (*loss of function*).

Il BDNF è una molecola appartenente alla famiglia delle neurotrofine (NGF family) e, sebbene espresso ubiquitariamente a livello del sistema nervoso centrale, esso è particolarmente abbondante a livello dell'ippocampo, del cervelletto, della corteccia cerebrale e dello striato. Circa il 95% del BDNF che si ritrova nello striato origina dalla corteccia cerebrale, mentre il rimanente 5% origina dalla Substantia Nigra (Baquet et al., 2004). L'espressione del BDNF aumenta con lo sviluppo del sistema nervoso centrale (Baquet et al., 2004), mentre il suo livello non diminuisce con l'avanzare

dell'età, facendo ritenere che oltre ad avere un ruolo essenziale per lo sviluppo neuronale, il BDNF abbia un ruolo cruciale per la sopravvivenza delle cellule del SNC dell'adulto (*Katoh-Semba, 1997*). Il fatto che il BDNF abbia un ruolo nel promuovere la sopravvivenza dei neuroni striatali (*Mangiarini et al., 1996*), che sono lesi nella Malattia di Huntington, ha fatto supporre che una diminuzione del suo valore endogeno, ampiamente dimostrato a livello corticale e striatale dei soggetti con Malattia di Huntington (*Zuccato et al., 2001*) nonché in numerosi modelli animali e cellulari (*Cattaneo et al., 2005*), possa contribuire all'insorgenza e/o alla progressione della malattia. Inoltre è stato dimostrato che, mentre l'huntingtina wt stimola la produzione di BDNF, l'huntingtina mutata riduce l'attività dei promotori del gene che codifica il BDNF e ciò si traduce in una diminuzione della trascrizione genica e conseguentemente dei livelli di BDNF a livello corticale (*Zuccato et al., 2001,2003,2005*). In secondo luogo è stato ipotizzato che l'huntingtina mutata possa interferire anche con il traffico intracellulare del BDNF e con il trasporto anterogrado di tale fattore dalla corteccia cerebrale a livello striatale (*Gauthier et al.,2004*).

Il BDNF è una proteina appartenente al gruppo della famiglia delle neurotrofine che, legandosi selettivamente al recettore TrkB e al recettore p75 delle neurotrofine, controlla in maniera autocrina e paracrina numerosi processi, tra cui la crescita, lo sviluppo, il differenziamento del sistema nervoso, la plasticità neuronale e infine, l'attività sinaptica e neurotrasmettitoriale (*Binder and Scharfman, 2004*). A livello cellulare il BDNF è espresso soprattutto a livello neuronale, ma recenti studi indicano che le cellule gliali possono produrre BDNF in particolari condizioni di forte stress metabolico (*Batchelor et al., 1999*). Inoltre il BDNF, legandosi ai recettori TrkB pre e post sinaptici, esercita una modulazione sinaptica e può stimolare in maniera autocrina il rilascio glutaminergico delle proiezioni corticali (*Schinder and Poo, 2000*) e può inibire le trasmissioni gabaergiche striatali.

Oltre a modulare i principali neurotrasmettitori, il BDNF interagisce anche con altri sistemi di neuromodulazione come, ad esempio, quello dei cannabinoidi e dell'adenosina. In particolare la relazione tra BDNF e l'adenosina è stata ampiamente indagata, nel tentativo sia di comprendere il ruolo di questo mediatore, e in particolare del suo recettore A_{2a}, nella patogenesi della Malattia di Huntington, sia di ricercare un possibile marker periferico di malattia e/o di stadio di malattia.

Il recettore A_{2a} è particolarmente abbondante nello striato e una quota di tali recettori è localizzata a livello dei terminali presinaptici delle connessioni corticostriatali, dove probabilmente incrementa il rilascio di glutammato. L'importanza del recettore per l'adenosina A_{2a} è data anche dal fatto che una sua disfunzione ben si correla con l'evoluzione della malattia, come evidenziato in ampi studi di coorte su pazienti HD e pre-HD (*Varani et al., 2003*). Ciò è dovuto al fatto che tale recettore è

ben rappresentato a livello striatale, e che la sua attività può essere misurata nelle piastrine a livello ematico periferico (B_{max} : platelet maximum number of A2a-receptor binding sites).

In particolare preme sottolineare che è stata messa in evidenza una correlazione lineare sia tra il valore B_{max} ed età di esordio della malattia, sia rispetto all'espansione della tripletta CAG (Maglione *et al.*, 2005, 2006), sia rispetto al fenomeno dell'anticipazione (Maglione *et al.*, 2005).

Sebbene risulti chiaro dai predetti studi che il livello di BDNF nello striato è direttamente influenzato dalla produzione corticale e dal suo trasporto anterogrado, recenti evidenze mettono in luce una forte interazione e dipendenza tra l'integrità dello striato e la produzione di BDNF (Canals *et al.*, 1998, 2001, 2004). Da questi studi emerge che il BDNF svolge un ruolo molto importante nella neuroprotezione striatale agli insulti tossici (e in questo senso l'huntingtina mutata può essere considerata tale) ma, come è chiaro nei modelli animali e dai reperti autoptici dei pazienti con malattia di Huntington, quando lo stimolo lesivo diviene prolungato il meccanismo di compenso viene meno per un probabile fenomeno di desensibilizzazione allo stimolo.

Un enorme passo avanti è stato ottenuto con la mappatura del gene che codifica per il BDNF, che ha permesso di comprendere sia come avviene la modulazione della sintesi di tale proteina sia l'interazione esistente tra huntingtina ed il BDNF (Liu *et al.*, 2005).

Il gene per il BDNF è costituito da 4 esoni in posizione 5' (I - IV) associati a specifici promotori e da un singolo esone in posizione 3' (V) che codifica per la proteina. L'importanza del BDNF nella malattia di Huntington risiede proprio nel fatto che l'huntingtina *wt* è in grado di interagire con i promotori e i silenziatori genici promuovendone la sintesi, mentre l'huntingtina mutata ha un effetto opposto. Studi preliminari (Fusco *et al.*, 2003) hanno dimostrato che l'huntingtina è coespressa con il BDNF ed essi sono co-localizzati nel 99% dei neuroni piramidali della corteccia cerebrale, mentre nello striato il 75% dei neuroni che esprimono huntingtina sono positivi per il BDNF. Successivamente è stato riportato che l'huntingtina *wt*, ma non l'huntingtina mutata, è in grado di stimolare la produzione di BDNF.

Una prima serie di studi *in vitro* volta a dimostrare l'influenza dell'huntingtina sul BDNF, è stata effettuata utilizzando dei modelli cellulari di malattia di Huntington (ST14A) provenienti dallo striato embrionale di ratti, successivamente incubati tramite retrovirus rispettivamente con huntingtina *wild-type* e con huntingtina mutata (Cattaneo and Conti, 1998). Le linee cellulari in cui era stata inserita l'huntingtina normale hanno mostrato un incremento dei livelli di BDNF, mentre nell'altra linea cellulare ciò non si è verificato.

Una seconda serie di esperimenti ha invece dimostrato tramite analisi con PCR che, più specificatamente, l'incremento di BDNF nelle linee cellulari con Huntingtina *wild-type* è dovuta

all'aumento della trascrizione del gene del BDNF grazie all'attivazione del promotore II (Zuccato *et al.*, 2001).

Infine una terza linea di ricerca, questa volta *in vivo*, è stata sviluppata utilizzando ratti transgenici in cui è stato inserito un cromosoma addizionale derivato dai lieviti (YAC: yeast-derived chromosome) che include il gene dell'huntingtina (Hodgson *et al.*, 1999). L'analisi del lisato corticale eseguito dopo nove mesi ha mostrato un aumento del livello del BDNF fino al 48% rispetto ai controlli, e in particolare nello striato e nell'ippocampo tale valore arrivava fino al 50%; inoltre come nel precedente studio è stato evidenziato che è l'attività del promotore II a incrementarne la produzione.

Un aumento della quantità di huntingtina *wild-type*, ma non di quella mutata, si è dunque dimostrata in grado di aumentare sia *in vitro* sia *in vivo* i livelli di BDNF, mentre il tessuto cerebrale e le cellule carenti di huntingtina endogena sono caratterizzati da una diminuzione di tale fattore.

Quindi mentre da una parte la sovraespressione di huntingtina non mutata porta ad un aumento di BDNF e in particolare di BDNF mRNA II, la carenza di tale proteina si traduce, come mostrato nei ratti knock-out, in un deficit di tali proteine, facendo deporre a favore dell'ipotesi della perdita di funzione (loss of function).

A partire da queste prove sperimentali e dal fatto che sia la corteccia cerebrale sia lo striato sono le sedi anatomiche in cui si evidenzia il maggior danno nei pazienti con Malattia di Huntington, si è cercato di quantificare il livello di BDNF nei modelli HD e di dimostrarne una correlazione con gli stadi e l'evoluzione della malattia.

Il primo modello studiato è quello sopraccitato delle linee cellulari ST14A che evidenzia la differenza nei valori di BDNF e mRNA BDNF tra le cellule incubate con huntingtina *wild-type* e quelle con huntingtina mutata. Una simile riduzione nei valori di BDNF è stata ottenuta in linee cellulari *knock-in* per l'huntingtina mutata, ottenute da ratti in cui un'espansione di 109 triplette CAG è stata inserita nel gene murino dell'huntingtina (Zuccato *et al.*, 2001); questo dato è dimostrato anche in cellule immortalizzate derivate dallo striato, in seguito all'espressione transitoria del gene dell'huntingtina ottenuta per via transgenica (Canals *et al.*, 2004).

Una seconda serie di studi, condotta su topi modificati geneticamente con un'espansione di 72 CAG (YAC72), ha dimostrato una riduzione significativa del BDNF a livello della corteccia, dello striato e dell'ippocampo; oltre a ciò quando i topi transgenici venivano esaminati a nove mesi dalla nascita, fase in cui non vi sono ancora sintomi patologici, vi era già una diminuzione del 30% del BDNF a livello corticale, evidenziando che tale diminuzione non è solamente un epifenomeno della neurodegenerazione ma che invece ha un ruolo primario nella patogenesi (Zuccato *et al.*, 2001).

Un altro modello di studio con topi transgenici, realizzato recentemente (*Gray et al., 2006*), utilizza cromosomi batterici (BAC: bacterial artificial chromosome) per permettere l'espressione di huntingtina con 103 residui poligluttammici; in questo studio però la riduzione di BDNF coincideva temporalmente con l'insorgenza dei sintomi.

Altri studi hanno mostrato una riduzione sia dei livelli di BDNF mRNA sia della proteina tradotta in dei modelli HD di topi transgenici solo per il segmento N-terminale della proteina mutata. Zhang e collaboratori (*Zhang et al., 2003*) hanno riportato che nei topi che presentavano un residuo N-terminale dell'huntingtina mutata di 150 poligluttammine (modello R6/2 *Mangiarini et al.*) vi era una riduzione del 50 % del BDNF nell'intero SNC alla dodicesima settimana dalla comparsa dei sintomi (definiti come impaccio motorio e difficoltà nell'apprendimento). Più recentemente Wang et al. (*Whang et al., 2006*) hanno dimostrato nello stesso modello murino e alla medesima settimana, che i neuroni corticostriatali della lamina V, che costituiscono la principale proiezione allo striato, mostrano un decremento del BDNF mRNA del 20% rispetto ai controlli. Infine sempre sullo stesso modello Zuccato e collaboratori (*Zuccato et al., 2005*) hanno dimostrato una riduzione del BDNF specificatamente a livello della corteccia cerebrale, sia nelle fasi sintomatiche sia nelle fasi presintomatiche, mentre Luthi-Carter (*Luthi-Carter et al., 2002*), sempre sullo stesso modello ha rilevato una diminuzione del BDNF a livello cerebellare a partire dall'ottava settimana.

Tutte queste evidenze depongono in favore di una riduzione del BDNF nelle cellule HD e nei modelli animali HD, e portano a ipotizzare la possibilità che una disfunzione simile sia presente nei soggetti affetti da malattia di Huntington.

Un altro importante punto su cui bisogna soffermarsi è quello riguardante l'attività del promotore II. Infatti sia nelle linee cellulari ST14A, sia nelle cellule *knock-in* per mutazioni omo o etero-zigotiche per l'huntingtina mutata, è dimostrata una diminuzione del BDNF mRNA II; inoltre saggi enzimatici a livello genetico confermano una diminuzione dell'attività del promotore II. Queste osservazioni sono supportate da studi *in vivo* che mostrano, sia in modelli murini YAC sia in quelli R6/2, la presenza di una notevole diminuzione dell'mRNA BDNF II (*Zuccato et al., 2005*). In questi termini si ha una visione specularmente opposta rispetto ai promotori del BDNF tra l'huntingtina *wild-type* e quella mutata.

In realtà come già accennato precedentemente il BDNF possiede quattro promotori noti denominati I, II, III e IV; mentre l'huntingtina *wild-type* interagisce solo con il promotore II e non ha effetti sugli altri tre, l'huntingtina mutata interagisce invece anche con il promotore III e IV condizionandone l'attività. Per quanto riguarda il promotore I i primi studi hanno dimostrato che esso è fisiologicamente attivato a bassi livelli mentre può essere stimolato dalla somministrazione di

acido kainico (*Metsis et al.*, 1993); per tale motivo questo promotore è stato definito come promotore inducibile *brain-specific*.

Due lavori (*Liu et al.*, 2006; *Aid et al.*, 2007) hanno mostrato che il promotore I è soggetto ad un'attivazione fisiologica, in quanto il suo mRNA può essere ritrovato nella corteccia cerebrale, nel cervelletto, nell'ippocampo, nel talamo, ma rimangono tuttora sconosciuti i meccanismi regolatori alla base della sua attivazione.

Il promotore III e IV sono invece meglio caratterizzati sia a livello molecolare, sia a livello funzionale. Il recettore III è regolato fundamentalmente dai segnali di calcio evocati dal recettore del glutammato N-methyl-D-aspartato (NMDA-R), mentre l'attività del recettore IV è regolata principalmente attraverso un recettore per i glucocorticoidi ed è influenzata dall'ormone tiroideo e dal corticosteroide. Numerosi studi (*Metsis et al.*, 1993, *Zuccato et al.*, 2001; *Hermel et al.*, 2004, *Zuccato et al.*, 2005) hanno dimostrato che una diminuzione della normale quantità di huntingtina è responsabile della riduzione della trascrizione del BDNF mediata dal promotore II (loss of function), laddove invece la riduzione della trascrizione da parte dei promotori III e IV, riflette l'attività tossica dell'huntingtina mutata

L'altro punto su cui porre l'attenzione per comprendere come la wt htt possa influenzare i livelli di BDNF riguarda il trasporto assonale e il trasporto delle vescicole contenenti BDNF. L'huntingtina è espressa principalmente nei neuroni a livello citoplasmatico; i compartimenti contenenti vescicole associate a proteine sono particolarmente ricchi in htt (*DiFiglia et al.*, 1995); E' probabilmente proprio grazie all'ipotetico legame con le vescicole che l'htt *wild-type* può essere trasportata per via anterograda e retrograda lungo gli assoni. E' emerso inoltre che l'huntingtina interagisce con le proteine *scaffold* (HAP1, dinactina) coinvolte nel trasporto assonale e nel trasporto vescicolare microtubulo-mediato (*Gunawardena et Goldstein*, 2004). Studi sperimentali, eseguiti sulla *drosophila melanogaster*, in cui era stata apportata una riduzione sperimentale dell'wt htt, hanno dimostrato una diminuzione del traffico assonale, mentre studi su cellule striatali embrionali di ratto con un solo allele per il gene IT-15, hanno evidenziato una progressiva immobilizzazione mitocondriale (*Trushina et al.*, 2004).

Il dato più rilevante, dimostrato nel 2004 da Gauthier, è che l'huntingtina *wild-type* è anche in grado di sostenere il trasporto vescicolare di BDNF all'interno degli assoni. Il BDNF è inizialmente sintetizzato come pro-BDNF nel reticolo endoplasmatico, viene poi trasportato al Golgi e agli arti organuli intracellulari e infine secreto nello spazio extracellulare nella forma matura dopo clivaggio proteolitico.

Un lavoro di Ferrer del 2000 ha analizzato il tessuto cerebrale di quattro soggetti con MH allo stadio III di malattia, comparato con i relativi controlli. I risultati evidenziarono che nei soggetti

affetti era presente una riduzione dal 53 all'82% nei valori di BDNF a livello del putamen e del caudato. Un altro lavoro condotto da Gautier (*Gautier et al.*, 2004) avvalorava i precedenti dati, dimostrando che in dieci pazienti il valore di BDNF era diminuito del 50% rispetto ai controlli nello striato. Un ultimo lavoro (*Zuccato et al.*, 2001) ha dimostrato, in due pazienti HD allo stadio II, un deficit del BDNF intorno al 50%, specificatamente nell'area fronto-parietale.

Un altro filone d'indagine si è aperto con la scoperta della presenza di un polimorfismo nel gene del BDNF (Val66Met), che ha una prevalenza nella popolazione di circa il 20-30% per l'eterozigosi, di 4% per l'omozigosi (*Sen et al.*, 2003). Questo polimorfismo è espresso solamente a livello del pro-BDNF. Alcuni studi hanno messo in evidenza che la presenza di tale polimorfismo altera il traffico intracellulare e il package del pro-BDNF e conseguentemente il rilascio di BDNF maturo (*Chen et al.*, 2004).

Un lavoro di Del Toro (*Del Toro et al.*, 2006) indaga l'effetto dell'huntingtina mutata sul traffico intracellulare e sul rilascio delle due forme di BDNF. Da questo studio è risultato che l'huntingtina mutata non altera il trasporto dal reticolo endoplasmatico al Golgi in nessuna delle due varianti di BDNF, mentre altera il trasporto delle vescicole Val66Val BDNF nel traffico post-Golgi.

A questo punto gli sforzi di ricerca si sono concentrati soprattutto nel dirimere la questione se il polimorfismo del BDNF possa influenzare l'età di esordio della malattia. Un lavoro di Alberch del 2005 (*Alberch et al.*, 2005) ha coinvolto 122 pazienti HD e 95 controlli. Lo studio ha mostrato che per un range di espansione compreso tra 42 e 49 triplette CAG il polimorfismo Val66Met era associato a un'età di esordio più tardiva.

Un altro lavoro italiano (*Di Maria et al.*, 2006) su 255 pazienti, non ha trovato correlazione tra età di esordio e polimorfismo del BDNF. Due altri due studi indipendenti, il primo eseguito su un campione di 228 pazienti early onset (EO : early onset) e 329 late onset (LO : late onset) (*Kishikawa et al.*, 2006), il secondo su 980 pazienti europei (*Metzger et al.*, 2006), hanno confermato che non c'è nessuna correlazione tra età di esordio e polimorfismo del BDNF.

TERAPIA

TERAPIA SINTOMATICA

Attualmente la terapia per la MH è esclusivamente sintomatica, ossia cerca di ridurre i sintomi sia motori sia non motori.

Uno dei principali farmaci utilizzati per le ipercinesie coreiche è la **tetrabenazina**, un derivato della reserpina, appartenente alla classe dei **depletori della dopamina**, che si lega in

maniera reversibile al trasportatore vescicolare delle monoamine VMAT2 a livello centrale portando a una deplezione cerebrale di dopamina, norepinefrina e serotonina.

Un'altra classe di farmaci sintomatici sono i **neurolettici tipici**. Questi farmaci, tra cui l'aloiperidolo, la pimozide, la flufenazina, la tioridazina, la sulpiride e la tiapride, sono stati ampiamente usati nella MH sia per trattare i sintomi psichici e comportamentali, che i movimenti coreici. Questi farmaci hanno un'alta affinità per i recettori D2 dopaminergici e frequentemente presentano effetti avversi, quali le sindromi parkinsoniane, l'acatisia, le distonie acute e le ipercinesie tardive. Il loro uso deve essere per tale ragione limitato preferendo l'uso dei **neurolettici atipici** come la clozapina, l'olanzapina, il risperidone.

Il trattamento dei sintomi parkinsoniani, quali la rigidità e la bradicinesia, che si manifestano soprattutto nelle forme Westphal o negli stadi tardivi della forma classica di malattia, si avvale di farmaci **dopaminergici** anche se non esistono studi conclusivi ma solo dei case reports sull'uso di tali farmaci (Reuter et al., 2000; Magnet et al., 2006). Un'altra classe farmacologica utilizzata per trattare i sintomi parkinsoniani della MH è rappresentata dagli **antiglutaminergici**, in particolare dall'amantadina, sebbene manchino studi univoci che dimostrano l'efficacia del farmaco e sebbene sicuramente tale farmaco non è da considerarsi di prima scelta, ma piuttosto di associazione. Altri farmaci antiglutaminergici come la remacemide, un antagonista non selettivo del recettore NMDA, la memantina, altro antagonista del recettore del glutammato, il riluzolo, un inibitore del rilascio del glutammato, sono stati testati ma nessuno di essi mostra un'inequivocabile azione favorevole sui sintomi o sulla capacità funzionale dei soggetti HD (da Adam and Jankovic, 2008).

La terapia con farmaci **GABA agonisti** è risultata inefficace nel trattamento dei sintomi della MH (Pearce et al., 1977; Symington et al., 1978), ma può essere utilizzata in presenza di mioclono corticale, in particolare è indicato l'uso di acido valproico o clonazepam.

I farmaci **antidepressivi** vengono spesso utilizzati in clinica per la frequente presenza di uno stato depressivo o depressivo-ansioso. Gli antidepressivi triciclici, come l'amitriptilina e l'imipramina, precedentemente utilizzati in clinica vengono oggi raramente prescritti, ma si preferisce l'uso degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI), quali il citalopram, l'escitalopram, la sertralina, la paroxetina, la fluoxetina, la fluvoxamina, in quanto oltre ad agire sulla depressione hanno anche un effetto positivo sui disturbi di ansia generalizzata, sul disturbo ossessivo compulsivo e sui disturbi di personalità.

Gli **inibitori dell'acetilcolinesterasi** (donepezil, rivastigmina, galantamina) non hanno dimostrato efficacia sui sintomi cognitivi nella Malattia di Huntington (Cubo et al., 2006).

Una delle prospettive future in ambito terapeutico è rappresentata dalla **DBS (Deep Brain Stimulation)** a livello del Pallido Interno (Gpi). Questa tecnica, già utilizzata con discreti effetti

nella Malattia di Parkinson, è stata per la prima volta usata su un paziente HD di 43 anni con corea rapidamente progressiva, nonostante la terapia con tetrabenazina, aloperidolo e amantadina, ma assenza di sintomi psichiatrici (*Moro et al., 2004*). Un secondo studio è stato condotto nel 2006 da Hebb e collaboratori (*Hebb et al., 2006*) su un paziente con movimenti coreoatetosici disabilitanti, non responsivo alla terapia farmacologica. Sebbene questi studi preliminari facciano ipotizzare che la Gpi *dps* abbia un effetto benefico a breve termine sulle ipercinesie, è difficile stabilire l'impatto a lungo termine di questa procedura e determinare gli ottimali parametri di stimolazione, per cui l'uso di tale procedura è da considerarsi ancora una sperimentazione.

TERAPIA GENICA

A partire dalla scoperta del gene causale della Malattia, è stata presa in considerazione la possibilità di proteggere le cellule neuronali dalla cascata di eventi che portano alla neurodegenerazione usando terapie geniche. Il miglior approccio sarebbe sicuramente modificare il gene mutato con un gene senza l'espansione patologica, ma oggi questa procedura non è tecnicamente attuabile; inoltre è dimostrato in modelli animali che è possibile down regolare o eventualmente silenziare l'espressione del gene mutato senza creare ulteriori danni (*Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995*). Un altro approccio è stato quello di esplorare la possibilità di bloccare l'espressione del gene mutato attraverso una mutazione nonsense o interferendo con l'RNAs (RNAs non coding) (*Dykxhoorn et al., 2003*), ma sebbene ciò è realizzabile *in vitro*, non è ancora praticabile nei modelli HD *in vivo* (*Boado et al., 2000*). Come strategia alternativa alla soppressione del gene IT-15 mutato, l'incremento di una varietà di fattori neurotrofici potrebbero promuovere la sopravvivenza e la differenziazione di specifiche popolazioni neuronali (BDNF, NGF, CNTF, neurotrofine NT-3 e NT-4/5) (*Saudou et al., 1998; Petersen et Brundin, 1999; Anderson et al., 1996; Perez-Navarro et al., 2000*). Poiché le molecole delle neurotrofine sono troppo grosse per attraversare la barriera ematoencefalica la somministrazione sottocutanea ha mostrato numerosi effetti collaterali senza alcuna risposta clinica (*Barinaga, 1994*). Si è cercato quindi di utilizzare la terapia genica per veicolare all'interno del tessuto cerebrale le neurotrofine, tramite vettori come il virus dell'herpes simplex, adenovirus, i lentovirus. Ciononostante permangono molti problemi legati al trasporto delle neurotrofine tramite virus. Una risposta parziale a queste problematiche viene da un'altra metodica che prevede il trapianto di cellule modificate *in vitro* con tecniche di ingegneria genetica cellulare. Cellule idonee per la terapia genica *ex vivo* sono facilmente ottenibili, sopravvivono *in vitro* e si dividono con ritmi sufficienti a mantenere l'espressione dei geni per le neurotrofine (*Tuszynski, 2002*). Queste cellule sono poi inserite in capsule di polimeri biocompatibili che contengono dei pori che permettono il rilascio delle neurotrofine, e l'entrata di

nutrienti e di ossigeno, ma che impediscono al sistema immunitario di venire in contatto con queste cellule e di rigettarle; infine queste capsule vengono impiantate nel tessuto cerebrale. Alcuni studi preliminari su modelli animali (*Mittoux et al.*, 2000; *Emerich et al.*, 1997) hanno mostrato un miglioramento del deficit motorio e cognitivo dopo l'impianto di tali capsule; uno studio in fase I su 6 pazienti ha testato la tollerabilità e la sicurezza della procedura (*Kordower et al.*, 1999).

TERAPIA RISTORATIVA

La terapia ristorativa cerca, tramite il trapianto cellulare, di riparare i circuiti cerebrali danneggiati e la loro funzionalità, sostituendo le cellule perse, in seguito ad eventi acuti, come lo stroke, o a processi neurodegenerativi cronici, come la MH. Il successo del trapianto cellulare nell'HD dipende innanzitutto dalla possibilità delle cellule trapiantate di sopravvivere e di sostituire le cellule perse, in secondo luogo dalla capacità di queste cellule di integrarsi nei circuiti cerebrali dell'ospite e di contribuire alla normale funzionalità dei processi cerebrali (*Lindvall and Hagell*, 2002). Questo approccio terapeutico potrebbe mostrarsi utile una volta dimostrata la sicurezza e l'efficacia nei modelli animali e nei clinical trials su pazienti con HD (*Cesaro P.*, 2004).

E' stato dimostrato che le cellule fetali striatali trapiantate sopravvivono nello striato dell'ospite, sviluppano afferenze ed efferenze e alleviano i sintomi sia motori sia cognitivi (*Kendall et al.*, 2001; *Dunnett et al.*, 2000). Il difetto di questi studi risiede nel fatto che essi si basano su modelli animali HD creati con danno eccitotossico (Acido Quinolonico) o metabolico (Acido 3-Nitropropionico) che riproducono meno fedelmente il processo neurodegenerativo dell'HD. Infatti ben pochi studi (*Dunnett et al.*, 1998; *van Dellen et al.*, 2001) sono stati effettuati su modelli transgenici di HD, probabilmente poichè questi ultimi sviluppano rapidamente diffuse inclusioni patologiche e poche aree localizzate di degenerazione cellulare, rendendoli inadatti a questo tipo di sperimentazione.

Quindi, sulla base di queste evidenze e sulla dimostrazione che anche nella Malattia di Parkinson il trapianto di tessuto embrionale porta ad un miglioramento dei sintomi motori (*Lindvall and Hagell*, 2002; *Widner et al.*, 1991; *Lindvall et al.*, 1990), sono iniziati in Nord America e in Europa studi clinici sul trapianto di cellule striatali in HD (*Sramka et al.* 1992, *Madrazo et al.*, 1995, *Kopyov et al.*, 1998, *Hauser et al.*, 2002, *Bachoud-Levi et al.*, 2000, 2006).

Sebbene da questi studi emergano preliminari evidenze che il trapianto cellulare possa avere un effetto benefico per il trattamento della MH, è necessario intraprendere altri clinical trials per confermare ulteriormente la sicurezza e l'efficacia della procedura. Sebbene la possibilità di usare le cellule staminali come fonte per i trapianti neuronali sia da tenere in considerazione, ci sono effettivi ostacoli da superare prima che queste cellule siano utilizzabili sull'uomo, e, attualmente, non è chiaro quale tipo di cellule staminali è più opportuno utilizzare.

TERAPIA NEUROPROTETTIVA

Grazie anche alle nuove scoperte riguardo ai meccanismi patogenetici della MH, gli studi farmacologici sono indirizzati soprattutto verso la messa a punto di molecole in grado di contrastare a livello molecolare i processi degenerativi e rallentare in tal modo la morte neuronale.

E' noto che la **via delle caspasi**, cisteino-aspartato proteasi, svolge un ruolo cruciale nell'attivazione dell'apoptosi e nella mediazione dell'infiammazione (*Eldadah et al.*, 2000) per cui è stato ipotizzato che una loro inibizione potrebbe offrire neuroprotezione. Nei modelli animali R6/2 la somministrazione di minociclina, un inibitore delle caspasi 1 e 3, ha mostrato un effetto anti-apoptotico e un ritardo nella progressione della malattia (*Chen et al.*, 2000).

Un altro importante bersaglio terapeutico è la **via eccitotossica**, legata ad un eccessivo rilascio di glutammato, in particolare a livello dei terminali sinaptici corticostriatali. Le strategie terapeutiche che colpiscono questa via sono indirizzate a bloccare l'eccessivo rilascio di glutammato o il suo legame a livello post-sinaptico. In realtà uno studio clinico (*Kremer et al.*, 1999) con lamotrigina, un antagonista del glutammato, non ha mostrato nei pazienti trattati un rallentamento della progressione di malattia, mentre invece ha mostrato una riduzione dei movimenti coreici. Anche un trial clinico multicentrico con riluzolo, un altro antagonista del glutammato, non ha evidenziato miglioramenti sul decorso della malattia (*Huntington Study Group*, 2003). La remacemide, un inibitore non competitivo del NMDA, è stato valutato in uno studio su HD in stadio precoce (*Kieburz et al.*, 1996); in questo studio, sebbene non ci fosse stata una differenza nella TFC tra il gruppo che assumeva il farmaco e il gruppo di controllo, è stato evidenziato un significativo miglioramento nei movimenti coreici, ma purtroppo il breve periodo di osservazione non ha permesso di stabilire la tollerabilità e l'efficacia a lungo termine del farmaco.

Una terza via coinvolta nella neurotossicità nell'HD riguarda la diminuzione dell'**attività mitocondriale**. Il CoQ₁₀ (coenzima Q₁₀) si è mostrato in grado di promuovere la sopravvivenza neuronale, di attenuare le lesioni striatali e di ridurre la perdita di peso e i deficit motori nei topi transgenici HD, sia quando somministrato da solo, sia quando veniva dato in associazione con la remacemide (*Matthews et al.*, 1998). Uno studio denominato CARE-HD (CoQ₁₀ and Remacemide), che si proponeva di comparare gli effetti di questi 2 farmaci sulla progressione della malattia, durante 30 mesi di trial (*Huntington Study Group*, 2001), non ha mostrato in realtà risultati significativi. Un altro farmaco, LAX-101, che ha effetti inibitori sulle caspasi e sulle fosfolipasi, e potrebbe anche avere un ruolo protettivo sull'attività mitocondriale, è stato testato (*Puri et al.*, 2005) ed ha mostrato un effetto positivo sul total motor score dell'UHDRS soprattutto nei soggetti con un basso numero di espansioni di triplette.

Un altro approccio terapeutico sperimentale, che parte dalla constatazione di una **disregolazione dei fattori di trascrizione genici** nella MH, prevede la somministrazione dell'inibitore dell'istone-deacetilasi (HDAC) per aumentare la disponibilità di siti di legame tra i fattori di trascrizione e il DNA promoter, e quindi la trascrizione genica (*Marks et al., 2004; Steffan et al., 2004; Hockly et al., 2003*).

Un altro approccio terapeutico sperimentale si fonda sull'azione neuroprotettiva del **BDNF**. In realtà la supplementazione di BDNF rimane tuttora problematica. Infatti il BDNF è relativamente instabile e solo una piccola quota di esso riesce ad attraversare la barriera ematoencefalica; inoltre una quota troppo elevata di BDNF potrebbe interferire con la plasticità neuronale e proprio per questi motivi sono stati effettuati solo pochi studi clinici con successo (BDNF study group Phase III, 1999; *Ochs et al., 2000*). Per ovviare a questi problemi sono stati sviluppati altri metodi come il trasferimento tramite vettori virali e altri approcci terapeutici che stimolano la sintesi endogena di BDNF.

Un altro campo di studio è quello dei **BDNF-mimetici**, composti sintetici che hanno il vantaggio di ovviare alla scarsa biodisponibilità delle neurotrofine naturali, ma che interagiscono con gli stessi recettori e con gli stessi target mantenendo le stesse proprietà neuroprotettive. (*O'Leary and Hughes, 2003; Fletcher and Hughes, 2006*). Oltre a questi approcci sperimentali gli studi sono indirizzati verso i farmaci che aumentano il livello di BDNF endogeno: inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (*Tardito et al., 2006*), **litio** (*Chuang, 2004*), memantina e riluzolo (*Marvanova et al., 2001; Mizuta et al., 2001; Katoh-Semba et al., 2002*) e la cistamina.

Parte II

SCOPO DELLA RICERCA

La Malattia di Huntington è un patologia neurodegenerativa genetica a trasmissione autosomica dominante dovuta ad espansione della tripletta CAG sul gene IT-15 che codifica per la proteina Huntingtina.

Clinicamente si manifesta con disturbi del movimento di tipo coreico, disturbi psichiatrici e cognitivi ad insorgenza nell'età adulta, classicamente tra i 30 e i 50 anni, e con un decorso che porta all'exitus in 15-20 anni.

Con il termine Late-Onset sono indicati i pazienti con esordio di malattia oltre i 50 anni di età (*Kremer et al 1993, Myers et al, 1995,*), esordio attualmente ristretto alla fascia di età uguale o superiore ai 60 anni (*James et al 1994, Lipe et al, 2009*).

Esistono pochi lavori (*Faught et al 1983, Myers et al, 1995, Britton et al 1995, Kremer et al 1993, James et al 1994, Andrich et al 2008, Lipe et al, 2009, Koutsis et al 2014, Cornejo-Olivas et al 2015*) specificatamente focalizzati sugli esordi tardivi di malattia; la maggior parte di essi riporta che agli esordi tardivi corrisponde una forma clinica più lieve rispetto alla forma ad esordio nell'età classica, caratterizzata da una prevalenza del disturbo motorio, da un lieve declino cognitivo e da una progressione di malattia più lenta rispetto ai pazienti con esordio classico. Tuttavia alcuni di questi lavori sono stati eseguiti prima della clonazione del gene causale di malattia, alcuni sono case report o sono studi numericamente ristretti o studi osservazionali non comparativi (ad eccezione degli ultimi lavori di *Koutsis del 2014* e di *Cornejo-Olivas del 2015* che confrontano un gruppo di pazienti LO con un gruppo di pazienti ad esordio in età classica).

I dati presenti in letteratura dimostrano una forte correlazione, inversamente proporzionale, tra il numero di ripetute CAG nell'allele patologico e l'età di esordio (*Myers, 2004*): esistono alleli a penetranza incompleta (36-39 CAG) in cui l'esordio è molto tardivo e ampie espansioni CAG che portano ad esordi precoci e gravi malattia (*Harper, 1991*). I lavori suddetti hanno diversi limiti: alcuni studi sono statisticamente criticabili per l'esiguo campione di pazienti, alcuni studi analizzano gli esordi tardivi di malattia indipendentemente dall'espansione CAG comprendendo quindi pazienti con espansioni a penetranza incompleta ad esordio anche sopra gli 80 anni, infine molti studi descrivono le caratteristiche cliniche dei pazienti LO senza tuttavia confrontarli con un gruppo adeguato di pazienti CO. Uno degli ultimi studi comparativi tra late-onset e classic-onset (*Koutsis et al. 2014*) comprende tutti i range di espansione CAG con un esordio di malattia molto variabile, con un bias di reclutamento e di comparazione tra gruppi.

Dai dati presenti in letteratura è ormai evidente che un esordio tardivo di malattia si correla a una bassa espansione di CAG (tra i 36 e i 43, *Lee et al 2012*).

Alla luce di quanto sopra descritto, con questa ricerca ci proponiamo quindi, attraverso una analisi di coorte osservazionale retrospettiva di comparare due gruppi di pazienti (uno ad esordio classico e uno ad esordio tardivo) affetti da malattia di Huntington con espansione CAG tra 40-42. La scelta di questo range di espansione nasce dalla considerazione che rappresenta il range di espansione più frequentemente espresso nella popolazione Huntington con la più alta variabilità di età e di modalità di esordio. Partendo quindi da un campione geneticamente omogeneo lo scopo della ricerca prevede di analizzare le caratteristiche cliniche dei due gruppi per confermare o smentire quanto già descritto seppur limitatamente in letteratura sul gruppo degli esordi tardivi. L'interesse di focalizzare la scelta su questa ristretta cerchia di pazienti nasce dalla considerazione che all'interno di una famiglia con esordi tardivi spesso i componenti della famiglia crescono con la convinzione che la patologia genetica in oggetto sia una malattia "del vecchio", ignorando completamente le modalità di trasmissione con il concetto della anticipazione generazionale e ignorando quindi la possibilità di essere avviati ad un adeguato counselling.

MATERIALE E METODI

Nel nostro studio sono presi in esame tutti i pazienti affetti da MH con un range di espansione CAG compresa tra 40 e 42 afferenti all'Ambulatorio di Malattie Rare dell'Ospedale H. Sacco e/o all'UO di Genetica e Malattie Degenerative dell'Istituto Carlo Besta dall'anno 2004 all'anno 2015. I pazienti sono stati seguiti per un follow-up medio di 3.5 anni (range 1-10 anni); 14 pazienti sono stati persi durante lo studio. Sono stati esclusi pazienti che non avevano un'adeguata anamnesi clinica e genetica e un FU di almeno 1 anno.

Sono stati quindi studiati 66 soggetti (31 M, 35 F), di cui 17 pazienti con un'espansione di 40 CAG, 20 pazienti con un'espansione di 41 CAG, 29 pazienti con un'espansione di 42 CAG.

L'età di esordio, in accordo con la letteratura internazionale, è stata definita come l'età in cui sono comparsi i sintomi **motori**, tipici o atipici. Con un'attenta raccolta anamnestica sono stati indagati eventuali sintomi non motori precedenti l'esordio motorio di malattia; sono stati indagati disturbi dell'umore e disturbi psichiatrici (P) soffermandoci in particolar modo sulla depressione, e disturbi cognitivi (C). Particolare attenzione è stata posta sui sintomi motori di esordio e la loro concomitanza o meno con disturbi psichiatrici (P) e/o cognitivi (C), così come riportati dai caregivers o rilevati dall'esaminatorie (M; M/P, M/C, M/C/P).

Il gruppo di pazienti è stato suddiviso in due sottogruppi in base all'età di esordio di malattia (mediana 59 anni):

- **Gruppo 1** (37 pazienti) con età di esordio ≤ 59 anni (*Classic Onset*);
- **Gruppo 2** (29 pazienti) con età di esordio ≥ 60 anni (*James et al 1994, Lipe et al, 2009, Late Onset*).

Per tutti i pazienti è stata eseguita un'accurata anamnesi personale e familiare, sono state raccolte precise informazioni riguardo dati anagrafici, storia di malattia, presenza di comorbilità associate, assunzione di terapie. E' stata inoltre, in tutti i casi, effettuata un'approfondita analisi genealogica. Tutti i pazienti hanno eseguito, dopo sottoscrizione di esplicito consenso informato, il test genetico per Malattia di Huntington presso l'IRCCS Istituto Neurologico "Carlo Besta" (Milano) secondo i parametri standardizzati per specificità e sensibilità. Il DNA è stato estratto da linfociti di sangue periferico. Il numero di triplette CAG nel gene IT-15 è stato determinato secondo protocollo descritto in letteratura (*Squitieri et al., 2003; Kremer et al., 1994*). La regione genica corrispondente all'esone 1 è stata amplificata tramite 3 coppie di oligonucleotidi fluorescenti fiancheggiati il tratto CAG, le dimensioni del frammento sono state determinate tramite elettroforesi capillare e analizzate mediante confronto con alleli sequenziati.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione clinica approfondita al momento della diagnosi (T0) e all'ultimo follow-up disponibile (T1) mediante scala UHDRS (I, II, III). Inoltre per tutti i pazienti è stata ricavata la scala di Functional Assessment (FA), la TFC (Total Functional Capacity Scale) e da essa lo Stage di malattia (sec. Shoulson e Fahn, 1979).

DESCRIZIONE DELLA CASISTICA

GRUPPO 1 esordio ≤ 59 anni di età:

- 37 soggetti : 20 maschi e 17 femmine;
- 33 pazienti presentavano familiarità per malattia di Huntington, 13 con trasmissione materna, 20 con trasmissione paterna;
- 6 pazienti avevano una espansione CAG di 40, 10 pazienti di 41, 21 pazienti di 42;
- scolarità media: 9.8 ± 3.5 anni;
- la media del numero di triplette CAG per l'allele minore era 18.5 ± 2.8 (range 15-27)
- i sintomi di esordio sono stati esclusivamente motori (M) in 25 pazienti, motori con disturbi cognitivi (M/C) in un paziente, motori con sintomi psichiatrici/comportamentali (M/P) in 8 pazienti, motorio con disturbi sia cognitivi sia psichiatrici (M/P/C) in 3 pazienti. Un disturbo depressivo maggiore era preesistente in 11 pazienti;
- l'età di esordio media è stata di 50.4 ± 5.7 anni con un range da 36 a 59 anni;
- l'età media al momento della diagnosi era di 53 ± 6.1 (range 40-65);

- la media degli anni di malattia alla diagnosi era di 3.3 ± 3 (range 1-11);
- il follow up medio è stato di 3.5 ± 2.6 anni (range 1-10 anni);
- l'età media dei pazienti al follow up era di 57.8 ± 6.5 (range 43-71);
- la media degli anni di malattia al follow up era di 6.5 ± 4 (range 2-17).

Al momento della diagnosi i pazienti presentavano queste caratteristiche cliniche:

- UHDRS total motor: media = 27.3 ± 20.6 (range 1 - 84);
 - corea : media = 6.9 ± 5.0 (range 0-21);
 - distonia: media = 1.6 ± 2.5 (range 0-11).
- UHDRS beavioural (rilevato su 32 pazienti): media = 10.9 ± 9.6 (range 0- 40).
- UHDRS cognitivo (rilevato su 19 pazienti):
 - Symbol digit test : media 20.9 ± 13.7 (range 0-46)
 - Test Fluenze verbali : media 16.7 ± 12.6 (range 0-42)
 - Test Fluente semantiche : media 10.9 ± 5 (range 0-20)
 - Stroop Color : media 52.7 ± 41.2 (range 0 -164)
 - Stroop Verbal : media 65.8 ± 30.5 (range 0-114)
 - Stroop Interference : media 27.5 ± 19.5 (range 0-75)
- TFC: media = 10.7 ± 3.0 (range 3-13);
- Functional Assessment: media = 20.0 ± 6.4 (range 5-25);
- Stage: 26 pazienti con stadio 1, 6 pazienti con stadio 2, 4 pazienti con stadio 3, 1 pazienti con stadio 4

Al follow up (31 pazienti, 6 missing)

- UHDRS total motor: media = 39.4 ± 23.3 (range 5 - 88);
 - corea : media = 7.2 ± 4.8 (range 0-21);
 - distonia: media = 3.4 ± 3.7 (range 0-13).
- UHDRS beavioural: media = 18.1 ± 12.0 (range 2-44).
- UHDRS cognitivo (rilevato su 28 pazienti):
 - Simbol digit test : media 16 ± 12.6 (range 0-46)
 - Test Fluenze verbali : media 15 ± 11.6 (range 0-41)
 - Test Fluente semantiche : media 8.1 ± 4.9 (range 0-22)
 - Stroop Color : media 41 ± 28.6 (range 0 -150)
 - Stroop Verbal : media 55 ± 30 (range 0-114)

- Stroop Interference : media 19.5 ± 15.4 (range 0-70)
- TFC: media = 7.3 ± 3.7 (range 2-13);
- Functional Assessment: media = 15 ± 6.7 (range 0-25);
- Stage: 8 pazienti stage 1, 9 pazienti stage 2, 12 pazienti stage 3, 2 paziente stage 4.

GRUPPO 2 esordio ≥ 60 anni di età:

- 29 soggetti: 11 maschi e 18 femmine;
- 20 pazienti presentavano familiarità per malattia di Huntington, 9 con trasmissione materna, 11 con trasmissione paterna.
- scolarità media: 8.4 ± 4.3 .
- 11 pazienti avevano una espansione CAG di 40, 10 pazienti di 41, 8 pazienti di 42.
- la media del numero di triplette CAG per l'allele minore era 18.3 ± 3.0 (range 12-24);
- i sintomi di esordio sono stati esclusivamente motori (M) in 22 pazienti, motori con disturbi cognitivi (M/C) in 2 pazienti, motori con sintomi psichiatrici/comportamentali (M/P) in 5 pazienti. Un disturbo depressivo maggiore era preesistente in 5 pazienti.
- l'età di esordio media è stata di 64.1 ± 3.8 con un range da 60 a 73 anni;
- l'età media al momento della diagnosi era di 68 ± 4.2 (range 61-75);
- la media degli anni di malattia alla diagnosi era di 4.0 ± 3 (range 1-11);
- il follow up medio (rilevato su 21 pazienti) è stato di anni 3.4 ± 2 (range 1-8.6 anni);
- l'età media dei pazienti al follow up era di 71 ± 4 (range 64 -78);
- la media degli anni di malattia al follow up era di 7.4 ± 3 (range 3-13).

Al momento della diagnosi i pazienti presentavano queste caratteristiche cliniche:

- UHDRS total motor: media = 30.3 ± 18.5 (range 6-72);
 - corea : media = 8.7 ± 5.8 (range 0-21);
 - distonia: media = 1.3 ± 2.0 (range 0-6);
- UHDRS beavioural (rilevato su 27 pazienti): media = 11.3 ± 10.3 (range 0-38);
- UHDRS cognitivo (rilevato su 13 pazienti):
 - Simbol digit test : media 15.8 ± 11.6 (range 0-33)
 - Test Fluenze verbali : media 17.7 ± 10.6 (range 1-36)
 - Test Fluente semantiche : media 10.5 ± 6.3 (range 4-20)
 - Stroop Color : media 49.1 ± 24.2 (range 11-87)
 - Stroop Verbal : media 62.0 ± 26.4 (range 15-102)

- Stroop Interference : media 20.1 ± 14.7 (range 0-45)
- TFC : media = 9.7 ± 3.5 (range 2-13);
- Functional Assessment: media = 18.5 ± 5.9 (range 7-25);
- Stage : 17 pazienti stage 1, 5 pazienti stage 2, 6 pazienti stage 3, 1 paziente stage 4.

Al follow up, 8 pazienti sono stati persi; dei restanti 21 pazienti:

- UHDRS total motor: media = 43.7 ± 24.8 (range 8-75);
 - corea : media = 8.6 ± 6.1 (range 0-21);
 - distonia: media = 2.2 ± 2.6 (range 0-9);
- UHDRS beavioural (rilevato su 20 pazienti): media = 12 ± 10.5 (range 0-38);
- UHDRS cognitivo (rilevato su 13 pazienti):
 - Simbol digit test : media 8.2 ± 9.4 (range 0-25)
 - Test Fluenze verbali : media 11.2 ± 11.3 (range 0-35)
 - Test Fluente semantiche : media 6.7 ± 4.1 (range 0-12)
 - Stroop Color : media 27.7 ± 21 (range 0-65)
 - Stroop Verbal : media 40.1 ± 32.3 (range 0-106)
 - Stroop Interference : media 13.1 ± 12.7 (range 0-35)
- TFC: media = 6.3 ± 4.8 (range 1-13);
- Functional Assessment: media = 12.5 ± 8.9 (range 0-25);
- Stage : 6 pazienti stage 1, 2 pazienti stage 2, 8 pazienti stage 3, 5 paziente stage 4

RISULTATI

Correlati demografici:

La popolazione in studio composta da 66 pazienti è così distribuita:

- Gruppo 1 (esordio ≤ 59 anni): 37 soggetti (56%)
 - 17 femmine (45.9%) e 20 maschi (54.1%)
 - 4 casi non familiari (10.8%), 33 con familiarità positiva (89.2%), 35.1% a trasmissione materna, 54.1% a trasmissione paterna (*Figura 1 A e B*)
 - scolarità media 9.8 ± 3.5
- Gruppo 2 (esordio ≥ 60 anni): 29 soggetti (44%)
 - 18 femmine (62.1%) e 11 maschi (37.9%)

- 9 soggetti non familiari (31%), 20 soggetti con familiarità positiva (69%), di cui il 31% materna, 38% paterna (*Figura 1 A e B*)

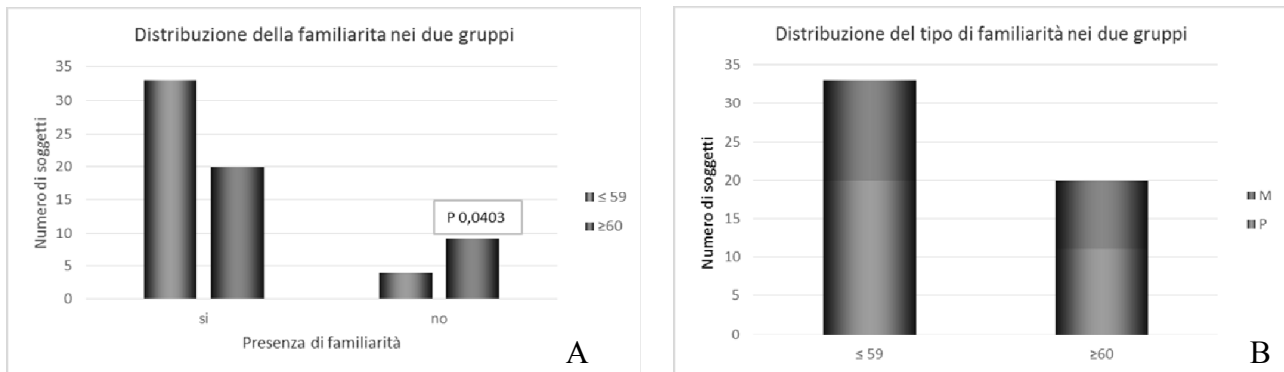


Figura 1 A e B: presenza o meno di familiarità e il tipo di trasmissione nei due gruppi di pazienti

L'analisi statistica tra le frequenze di genere ($p = 0.1927$) e la scolarità ($p = 0.0927$) eseguita tramite Test χ^2 , non ha dato una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di soggetti mentre è stata rilevata una differenza statisticamente significativa tra la presenza o meno di familiarità tra due gruppi ($p = 0.0403$). Studiando solo i casi con familiarità positiva nel gruppo 1, 22 casi (41.5%) avevano trasmissione materna e 31 (58.5%) avevano trasmissione paterna; nel gruppo 2, 9 casi (45%) avevano trasmissione materna e 11 (55%) trasmissione paterna; non è stata rilevata differenza statisticamente significativa tra i due gruppi e il tipo di trasmissione.

Frequenza dei sintomi di esordio nelle due popolazioni

47 pazienti hanno avuto un esordio esclusivamente motorio (M) a fronte di 19 pazienti con esordio motorio associato a disturbo psichiatrico e/o cognitivo (M+). Il 71.2% dei pazienti con esordio ≤ 59 anni hanno avuto un esordio M, contro il 67.6% dei pazienti con esordio ≥ 60 anni; il 28.8% dei pazienti con esordio ≤ 59 anni hanno avuto un esordio M+, contro il 32.4% dei pazienti con esordio ≥ 60 anni. La *figura 2* mostra la frequenza del tipo di esordio (M o M+) nei due gruppi di pazienti. In particolare in *tabella 1* sono riportate le frequenze dei sintomi all'esordio (C: disturbo cognitivo, P: disturbo psichiatrico, P+C: disturbo psichiatrico e cognitivo).

| | All | | Età di Esordio | | | | Test Chi-quadro |
|--|-----|------|----------------|------|------|------|-----------------|
| | | | < 59 | | ≥ 60 | | (Fisher se *) |
| | N | % | N | % | N | % | P |
| Disturbo Cognitivo | | | | | | | |
| No | 60 | 90.9 | 33 | 89.2 | 27 | 93.1 | 0.6875* |
| Si | 6 | 9.1 | 4 | 10.8 | 2 | 6.9 | |
| Disturbo Psichiatrico | | | | | | | |
| No | 50 | 75.8 | 26 | 70.3 | 24 | 82.8 | 0.2400 |
| Si | 16 | 24.2 | 11 | 29.7 | 5 | 17.2 | |
| Disturbo cognitivo e psichiatrico | | | | | | | |
| No | 63 | 95.5 | 34 | 91.9 | 29 | 100 | 0.2497* |
| Si | 3 | 4.5 | 3 | 8.1 | . | . | |

Tabella 1: frequenza dei sintomi di esordio associati al sintomo motorio

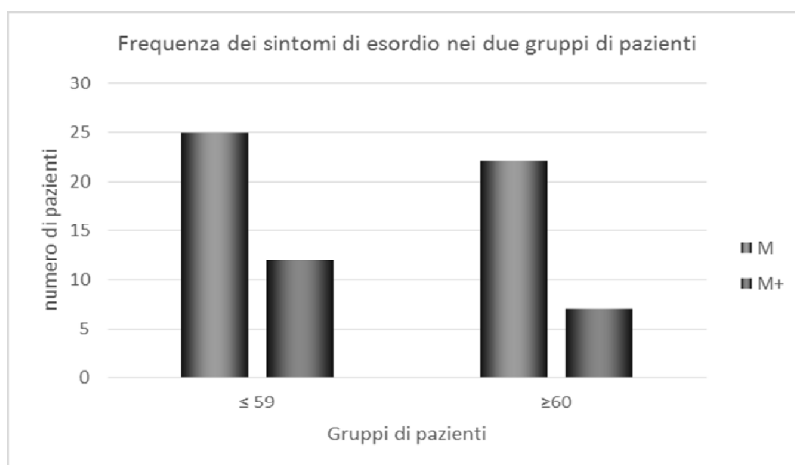


Figura 2: frequenza del tipo di esordio (M o M+) nei due gruppi di pazienti

L'analisi eseguita tramite Test χ^2 non ha mostrato differenze statisticamente significative.

Frequenza dello stadio di malattia all'esordio nei due gruppi

54 pazienti, di cui 81% con esordio sotto i 60 anni e 86.5% ≥ 60 anni, avevano alla diagnosi uno stadio di malattia lieve (stadio 1-2), mentre il 18.2% del gruppo ≤ 59 anni e il 13.5% del gruppo sopra i 60 anni avevano alla diagnosi uno stadio severo (stadio 3-4) di malattia. L'analisi eseguita tramite Test χ^2 non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

Frequenza del sintomo depressivo prima della diagnosi nei due gruppi

16 pazienti avevano manifestato sintomi depressivi prima della diagnosi di Malattia di Huntington: 11 appartenevano al gruppo 1 (≤ 59 anni), 5 pazienti al gruppo 2 (≥ 60 anni); l'analisi eseguita tramite Test χ^2 non ha mostrato differenze statisticamente significative.

Caratteristiche genetiche della popolazione:

Le caratteristiche genetiche della popolazione in esame erano così suddivise (tabella 2):

| | All | | Età di Esordio | | | | Test Chi-quadro |
|---------------|-----|------|----------------|------|-----|------|-----------------|
| | | | < 59 | | ≥60 | | (Fisher se *) |
| | N | % | N | % | N | % | P |
| CAG_up | | | | | | | |
| 40 | 17 | 25.8 | 6 | 16.2 | 11 | 37.9 | 0.0403 |
| 41 | 20 | 30.3 | 10 | 27.0 | 10 | 34.5 | |
| 42 | 29 | 43.9 | 21 | 56.8 | 8 | 27.6 | |

Tabella 2: frequenza del numero di triplette CAG patologiche nei due gruppi

L'analisi delle frequenze mediante test chi-quadro ha evidenziato una significatività statistica per quanto riguarda l'espansione della tripletta patologica nei due gruppi di pazienti. In particolare è evidente una correlazione inversamente proporzionale tra il numero di triplette e l'età di esordio di malattia (Figura 3 A-B).

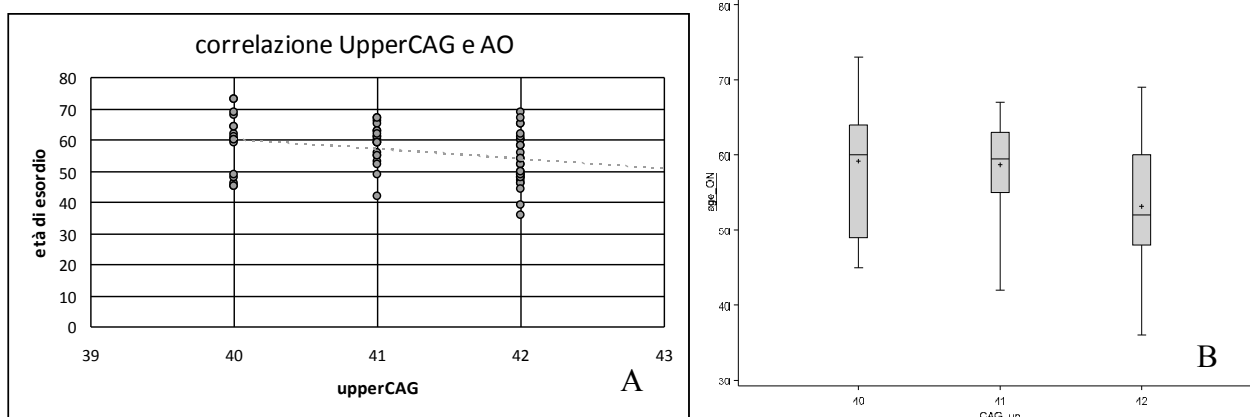


Figura 3 A-B: correlazione tra il numero di triplette CAG patologico e l'età di esordio (age_on)

Correlazione tra l'allele minore e l'età di esordio:

Nella popolazione in studio la media del numero di CAG lower era di 18.4 ± 2.9 (range 12-27). Nel gruppo 1 la media del numero di CAG nell'allele minore (lower CAG) era di 18.5 ± 2.8 ; nel gruppo 2 18.3 ± 3.0 . Non vi era differenza statisticamente tra il confronto di medie (tes di Wilcoxon, p 0.94). Correlando il numero di CAG dell'allele minore con l'età di esordio in tutta la popolazione e nei due sottogruppi non vi era correlazione statisticamente significativa.

Differenze nei dati clinici tra i due gruppi alla diagnosi

In *tabella 4* sono indicati i valori medi, deviazione standard e i relativi range degli scores degli items dell'UHDRS (motorio [totale, corea, distonia], comportamentale, cognitivo [digit symbol, stroop test, fluenze semantiche e verbali], TFC, FA).

In tutti i parametri esaminati non sono state ritrovate differenze statisticamente significative tra i due gruppi (*Tabella 3, figura 4,5,6*).

| | Età di esordio | | | | | | | | | | | | | | Test Wilcoxon P |
|--------------------------|----------------|------|------|------|--------|-----|-------|-----------|------|------|------|--------|------|-------|-----------------------|
| | ≤ 59 anni | | | | | | | ≥ 60 anni | | | | | | | |
| | N | NMis | Mean | Std | Median | Min | Max | N | NMis | Mean | Std | Median | Min | Max | |
| Dystonia Score | 37 | 0 | 1.6 | 2.5 | 1.0 | 0.0 | 11.0 | 29 | 0 | 1.3 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 6.0 | 0.4732 |
| Chorea Score | 37 | 0 | 6.9 | 5.0 | 7.0 | 0.0 | 21.0 | 29 | 0 | 8.7 | 5.8 | 8.0 | 0.0 | 21.0 | 0.2368 |
| Total Motor Score | 37 | 0 | 27.3 | 20.6 | 20.0 | 1.0 | 84.0 | 29 | 0 | 30.3 | 18.5 | 26.0 | 6.0 | 72.0 | 0.3792 |
| Functional Assessment | 37 | 0 | 20.0 | 6.4 | 23.0 | 5.0 | 25.0 | 29 | 0 | 18.5 | 5.9 | 19.0 | 7.0 | 25.0 | 0.1987 |
| Total Function Capacity | 37 | 0 | 10.7 | 3.0 | 12.0 | 3.0 | 13.0 | 29 | 0 | 9.7 | 3.5 | 11.0 | 2.0 | 13.0 | 0.2172 |
| Behavioral Score | 32 | 5 | 10.9 | 9.6 | 9.0 | 0.0 | 40.0 | 27 | 2 | 11.3 | 10.3 | 9.0 | 0.0 | 38.0 | 10.000 |
| Symbol Digit Score | 19 | 18 | 20.9 | 13.7 | 20.0 | 0.0 | 46.0 | 12 | 17 | 15.8 | 11.6 | 15.0 | 0.0 | 33.0 | 0.3174 |
| Verbal Fluence | 19 | 18 | 16.7 | 12.6 | 13.0 | 0.0 | 42.0 | 13 | 16 | 17.7 | 10.6 | 19.0 | 1.0 | 36.0 | 0.6618 |
| Semantic Fluence | 18 | 19 | 10.9 | 5.0 | 11.5 | 0.0 | 20.0 | 11 | 18 | 10.5 | 6.3 | 7.0 | 4.0 | 20.0 | 0.6235 |
| Stroop Test Interference | 19 | 18 | 27.5 | 19.5 | 20.0 | 0.0 | 75.0 | 13 | 16 | 20.1 | 14.7 | 21.0 | 0.0 | 45.0 | 0.4707 |
| Stroop Test Verbal | 19 | 18 | 65.8 | 30.5 | 60.0 | 0.0 | 114.0 | 13 | 16 | 62.0 | 26.4 | 65.0 | 15.0 | 102.0 | 0.7319 |
| Stroop Test Color | 19 | 18 | 52.7 | 41.2 | 36.0 | 0.0 | 164.0 | 13 | 16 | 49.1 | 24.2 | 52.0 | 11.0 | 87.0 | 0.6347 |

Tabella 3: valori medi, deviazione standard e i relativi range degli scores degli items dell'UHDRS I, II, III, TFC e FA

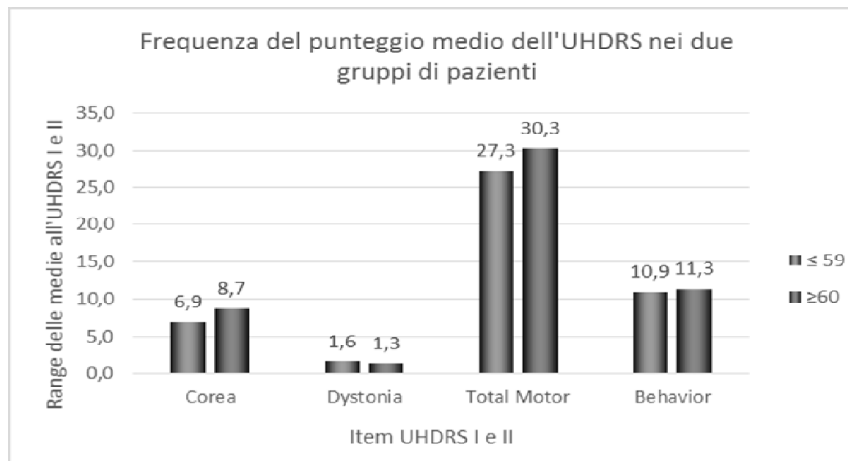


Figura 4: punteggio medio nei due gruppi di pazienti nell'UHDRS I (corea, distonia e totale) e II

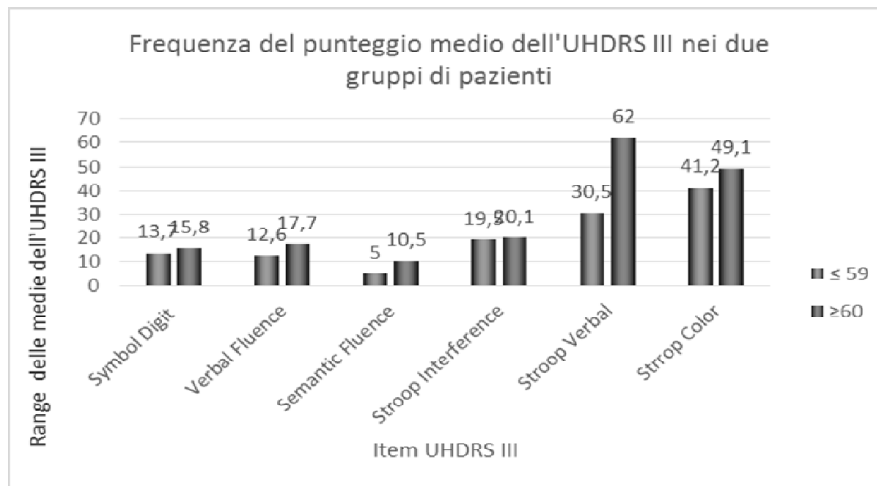


Figura 5: punteggio medio nei due gruppi di pazienti nell'UHDRS III

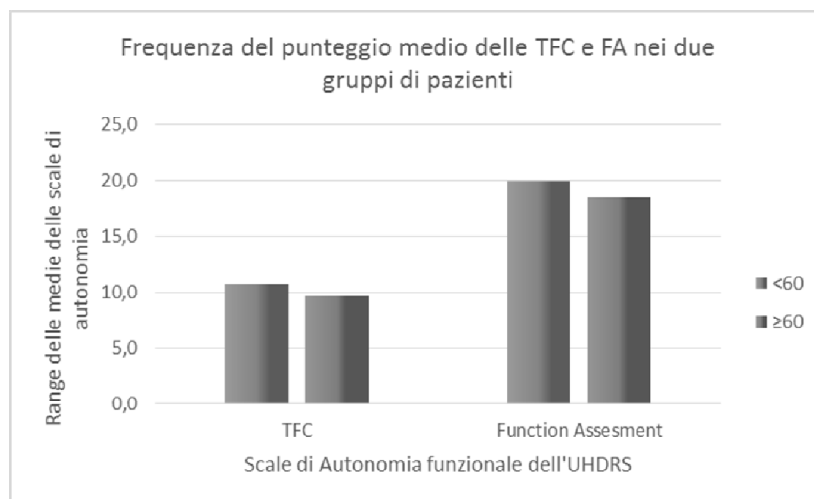


Figura 6: punteggio medio nei due gruppi di pazienti nelle scale TFC e FA

Differenze nei dati clinici tra i due gruppi alla diagnosi esaminati tramite regressione logistica

Tutti gli scores (score motorio tot, score corea e distonia, score comportamentale, FA, TFC, stage) sono stati ulteriormente analizzati secondo un'analisi di regressione logistica correggendo i valori per anni di malattia e per CAG patologico (*yrs_DISI*, *CAG_up*); per gli scores cognitivi i parametri sono stati corretti anche per la scolarità (*edu*). Anche tramite questa analisi non si sono evidenziate differenze statisticamente significative.

Differenze nei dati clinici tra i due gruppi al follow up

Il follow up medio nel gruppo 1 è stato di di 3.5 ± 2.6 anni, nel gruppo 2 di 3.4 ± 2 ($p = 0.9501$).

In *tabella 5* sono indicati i valori medi, deviazione standard e i relativi range degli scores degli items dell'UHDRS esaminati al follow-up (motorio [totale, corea, dystonia], comportamentale, cognitivo [digit symbol, stroop test, fluenze semantiche e verbali], TFC, FA).

In tutti i parametri esaminati non sono state ritrovate differenze statisticamente significative tra i due gruppi (*Figura 7,8,9*).

| | età di esordio | | | | | | | | | | | | | | Wilcoxon P Test Fisher |
|-----------------------|----------------|-----------|------|------|--------|-----|-------|-----------|-----------|------|------|--------|-----|-------|---------------------------|
| | ≤ 59 anni | | | | | | | ≥ 60 anni | | | | | | | |
| | N | NMissions | Mean | Std | Median | Min | Max | N | NMissions | Mean | Std | Median | Min | Max | |
| Dystonia Score | 31 | 6 | 3.4 | 3.7 | 2.0 | 0 | 13 | 21 | 8 | 1.3 | 2 | 2 | 0 | 9 | |
| Chorea Score | 31 | 6 | 7.2 | 4.8 | 7.0 | 0 | 17 | 21 | 8 | 8.7 | 5.8 | 7 | 0 | 21 | |
| Total Motor Score | 31 | 6 | 39.4 | 23.3 | 34 | 5.0 | 88.0 | 21 | 8 | 43.7 | 24.8 | 50.5 | 8.0 | 75.0 | 0.4464 |
| Functional Assessment | 31 | 6 | 15.1 | 6.7 | 15.0 | 0.0 | 25.0 | 21 | 8 | 12.6 | 9 | 10.0 | 0.0 | 25.0 | 0.2365 |
| Total Function Comp | 31 | 6 | 7.3 | 3.7 | 7.0 | 2.0 | 13.0 | 21 | 8 | 6.3 | 4.8 | 5 | 1.0 | 13.0 | 0.2613 |
| USStg2 | 31 | 6 | 2.3 | 0.9 | 2.0 | 1.0 | 4.0 | 21 | 8 | 2.6 | 1.2 | 3.0 | 1.0 | 4.0 | 0.2709 |
| 1 | 8 | | | | | | | 6 | | | | | | | 0.1732 (Test Fisher) |
| 2 | 9 | | | | | | | 2 | | | | | | | |
| 3 | 12 | | | | | | | 8 | | | | | | | |
| 4 | 2 | | | | | | | 5 | | | | | | | |
| Behavioral Score | 31 | 6 | 18.1 | 11.7 | 15.0 | 2.0 | 44.0 | 20 | 9 | 12 | 10.5 | 12 | 0.0 | 38.0 | 0.0753 |
| Symbol Digit Score | 27 | 10 | 16 | 12.6 | 15.5 | 0.0 | 46.0 | 13 | 16 | 8.2 | 9.4 | 4.5 | 0.0 | 25.0 | 0.0754 |
| Verbal Fluence | 27 | 10 | 15 | 11.6 | 13 | 0.0 | 41.0 | 13 | 16 | 11.2 | 11.3 | 8 | 0.0 | 35.0 | 0.2319 |
| Semantic Fluency | 27 | 10 | 8.1 | 4.9 | 7.5 | 0.0 | 22.0 | 13 | 16 | 6.8 | 4.1 | 7 | 0.0 | 12.0 | 0.4773 |
| Stroop Test Inter | 27 | 10 | 19.5 | 15.4 | 17 | 0.0 | 70.0 | 13 | 16 | 13.1 | 12.7 | 10.0 | 0.0 | 35.0 | 0.2533 |
| Stroop Test Vert | 27 | 10 | 55 | 29.6 | 52 | 0.0 | 114.0 | 13 | 16 | 40.1 | 32.3 | 40.0 | 0.0 | 106.0 | 0.1321 |
| Stroop Test Cold | 27 | 10 | 41 | 28.6 | 35 | 0.0 | 150.0 | 13 | 16 | 27.7 | 21 | 26 | 0.0 | 65.0 | 0.2194 |

Tabella 5: valori medi, deviazione standard e i relativi range degli scores degli items dell'UHDRS I, II, III, TFC e FA al FU

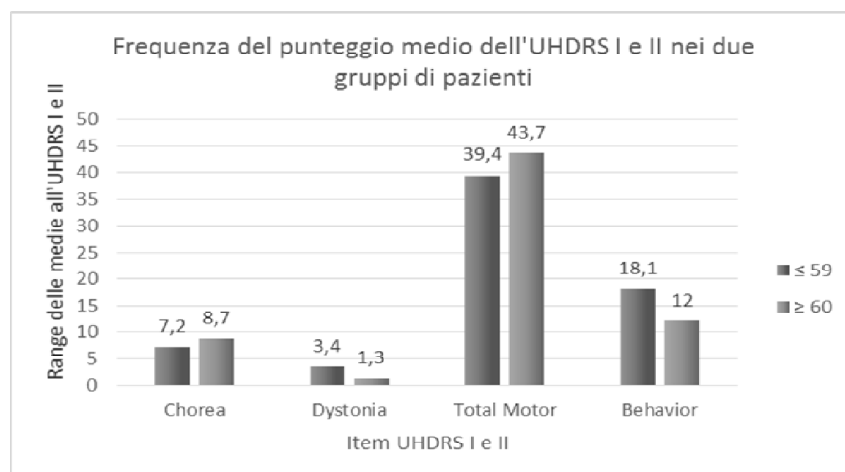


Figura 7: punteggio medio nei due gruppi di pazienti nell'UHDRS I (corea, dystonia e totale) e II al FU

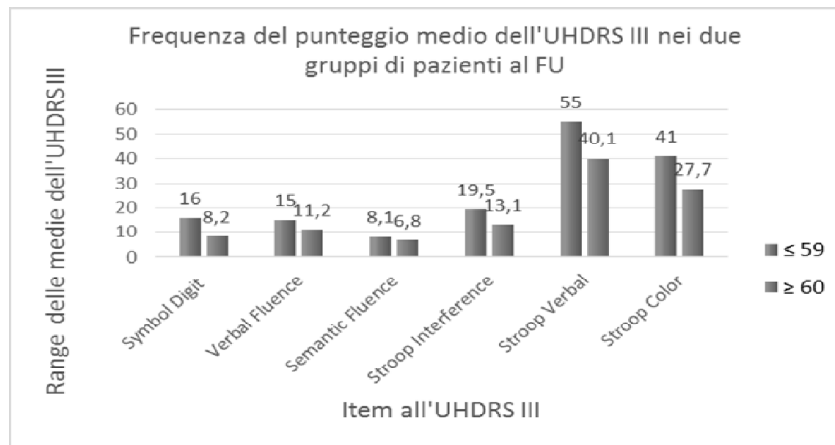


Figura 8: punteggio medio nei due gruppi di pazienti nell'UHDRS III al FU

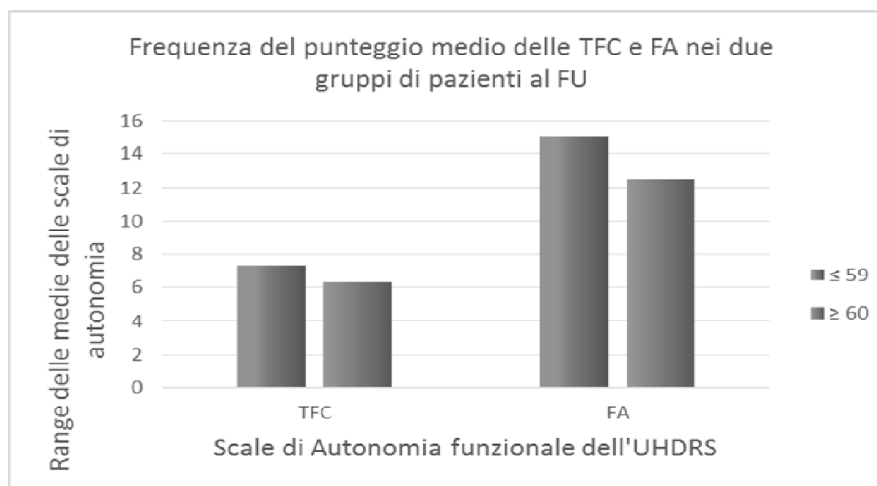


Figura 9: punteggio medio nei due gruppi di pazienti nelle scale TFC e FA al FU

Calcolo della variazione media di scores secondo il metodo GENMOD procedure

Tramite l'analisi statistica GENMOD è stato eseguito il calcolo della variazione media a tre anni di malattia (follow-up medio nei due gruppi) degli scores Motorio Totale, Comportamentale Totale, TFC, e stadio di malattia. Non vi sono differenze statisticamente significative nei due gruppi.

Progressione di malattia nei due gruppi

Tramite analisi di Kaplan-Meier è stata valutata la progressione di malattia nei due gruppi intesa come probabilità di raggiungere uno stadio peggiore di malattia.

La cura di sopravvivenza non mostra differenza statisticamente significative.

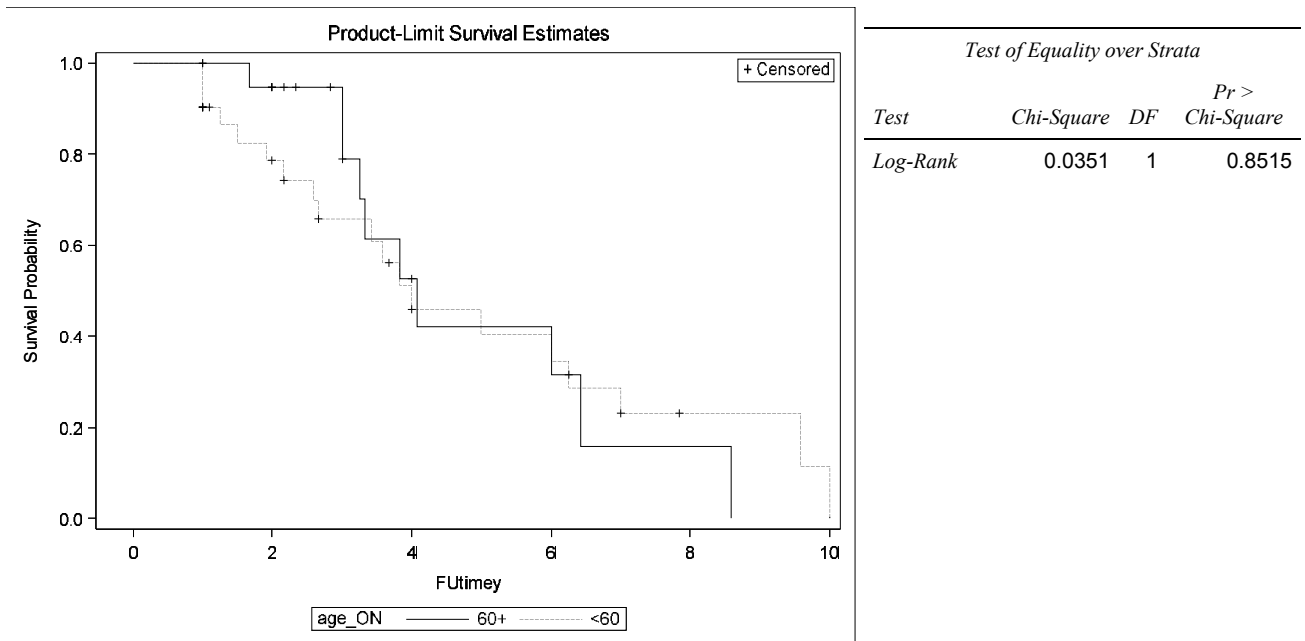


Figura 10: curva di sopravvivenza nei due gruppi di pazienti

DISCUSSIONE

Da quando è possibile la diagnosi genetica diretta di Malattia di Huntington, sempre più numerose sono le descrizioni di pazienti con esordio tardivo di malattia, ossia con età di insorgenza dei sintomi motori sopra i 60 anni di età (*James et al 1994, Lipe et al, 2009, Koutisis et al. 2014*). Pochi sono i lavori di letteratura dedicati specificatamente agli esordi tardivi ed inoltre sono rappresentati o da descrizioni di singoli casi o da studi osservazionali non randomizzati di pochi pazienti; questi lavori mostrerebbero una relativa benignità dei pazienti con esordi tardivi, rappresentata da lievi disturbi del movimento, lieve decadimento cognitivo, assenza di disturbi psichiatrici e progressione più lenta (*Faught et al 1983, Kremer et al 1993, James et al 1994, Myers et al, 1995, Britton et al 1995, Andrich et al 2008, Lipe et al, 2009*). Un recente studio osservazionale comparativo (*Kotusis et al 2014*) evidenzia l'assenza di differenze cliniche all'esordio tra i pazienti con esordio sopra e sotto i 60 anni ed evidenzia una progressione di malattia peggiore nel gruppo ad esordio tardivo. Tale studio prende però in esame tutta la popolazione di pazienti con Malattia di Huntington indipendentemente dall'espansione genetica (range CAG 36-62). Anche il recente studio di Cornejo del 2015 ha confermato che i pazienti Late onset avevano una forma di malattia più lieve comparandolo con un gruppo ad esordio classico. L'obiettivo della nostra ricerca è stato quello di analizzare le caratteristiche cliniche di un ampio numero di pazienti affetti da MH aventi di base un corredo genetico uniforme (espansione CAG compreso tra 40 e 42). All'interno di questo gruppo i pazienti sono stati divisi in base all'età di esordio in: gruppo 1, esordio in età classica (≤ 59 anni), gruppo 2 ad esordio tardivo (≥ 60 anni di età) al fine di confermare o smentire se possa o meno identificarsi una specifica 'forma benigna tardiva' di malattia.

Le caratteristiche demografiche delle due popolazioni non differivano in genere e scolarità, mentre è stata documentata nei pazienti con esordio tardivo una maggior frequenza di casi con apparente assenza di familiarità; tale dato è in accordo con i dati di letteratura. Rispetto al tipo di trasmissione, materna o paterna, non è invece stato evidenziata una differenza significativa, dato che si discosta dei precedenti lavori che mostrano una prevalenza della trasmissione materna negli esordi tardivi (*Myers et al., 1983; Farrer et al., 1985*).

A livello genetico, nonostante la popolazione sia stata precedentemente selezionata per range di espansione CAG 40-42, è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi essendo le espansioni minori più rappresentate nel gruppo dei pazienti con età superiore ai 60 anni. Non sono state invece rilevate correlazioni tra l'allele minore e l'età di esordio, dato già ampiamente verificato in letteratura.

Sono stati valutati i sintomi di presentazione alla diagnosi suddividendo i gruppi in pazienti con esordio esclusivamente motorio (M) dai pazienti con esordio motorio associato a manifestazioni psichiatriche (M+P), a disturbi cognitivi (M+C), o entrambi (M+P/C); non sono state evidenziate differenze nella frequenza di presentazione clinica alla diagnosi. In particolare non sono state individuate differenze per quanto riguarda la presenza e la gravità del sintomo coreico tra i due gruppi.

Alla diagnosi i parametri esaminati secondo la scala UHDRS I-II-III non hanno evidenziato differenze significative tra i valori medi nei due gruppi, a parità di anni di malattia; tale dato contraddice i primi studi sugli esordi tardivi, ma si allinea con il recente lavoro sopracitato (*Koutsis et al, 2014*). Un'analisi più approfondita di conferma è stata eseguita tramite procedura di regressione logistica correggendo i dati per anni di malattia, espansione genetica e per scolarità per i soli items cognitivi. Anche con tale analisi non sono state evidenziate differenze significative.

I pazienti sono stati poi valutati all'ultimo follow-up disponibile; la media degli anni di follow-up e degli anni di malattia non differiva nei due gruppi per cui è stato possibile eseguire un confronto dei dati clinici. Sono stati valutati gli stessi parametri della diagnosi (UHDRS I-II-III) ed anche al follow-up non sono emerse differenze significative. È importante tuttavia sottolineare la presenza di numerosi "missing" in particolare per la parte cognitiva; per tale motivo è stata fatta un'analisi più accurata considerando solo i pazienti che avevano dati clinici completi sia al base-line che al follow-up. Anche in questa analisi non vi erano differenze statisticamente significative.

È stata calcolata la progressione di malattia valutando la variazione media a tre anni di malattia (follow-up medio) per lo score motorio, lo score comportamentale, la TFC (total functional capacity) e lo stadio di malattia. L'analisi non ha evidenziato differenze nella progressione stimata di malattia tra i due gruppi.

Infine è stata ricavata per lo stadio di malattia un'analisi Kaplan-Meier per i due gruppi considerando la probabilità annua di raggiungere uno stadio di malattia peggiore; i due gruppi non si discostano significativamente.

In conclusione analizzando le caratteristiche cliniche alla diagnosi e al follow-up non sono emerse differenze significative tra i pazienti con esordio tardivo di malattia rispetto a quelli con esordio in età classica né sono emerse differenze nell'evoluzione e nella prognosi di malattia. Da questo ampio studio, geneticamente omogeneo, è emerso pertanto che non esiste una variante fenotipica di Malattia di Huntington ad esordio tardivo né tanto meno che agli esordi tardivi di malattia corrisponde una maggior benignità della malattia stessa. Questo dato è in contraddizione

con i precedenti lavori che, seppur con i limiti di reclutamento e di casistica, evidenziavano una minor compromissione clinica, cognitiva e neuropsicologica in pazienti con esordio tardivo.

Tali dati sono di notevole importanza pratica per il medico specialista che si trova ad affrontare casi ad esordio tardivo: spesso accade che in ambito ambulatoriale i familiari dei soggetti affetti siano convinti che la patologia genetica familiare sia una malattia “del vecchio”. I familiari, che sono tutti soggetti a rischio di aver ereditato la malattia, hanno la convinzione che la patologia essendo esordita in età avanzata sia “benigna” e che spesso la morte sopraggiunga per le comorbidità preesistenti. Partendo sicuramente dalla convinzione che un esordio tardivo di malattia sia sicuramente più “benigno” in termini di gestione del malato, della malattia e di qualità di vita precedente rispetto a un esordio in età giovanile, i familiari ignorano completamente le modalità di trasmissione della malattia (anticipazione generazionale) e quindi la possibilità di essere avviati ad un adeguato counselling genetico. Non bisogna mai dimenticare che quando si fa diagnosi di malattia di Huntington la patologia non è del singolo soggetto ma diventa inevitabilmente una malattia della famiglia.

Rimane da chiarire l'eventuale presenza di fattori modificanti l'età di esordio di malattia, al momento non noti, responsabili dell'ampia variabilità dell'età di insorgenza di malattia a parità di espansione di triplette CAG. Dal nostro studio risulta che l'età tardiva di esordio è l'unico fattore di benignità di malattia e quindi conoscerne eventuali fattori modificanti dovrà essere il target futuro di ricerca.

BIBLIOGRAFIA

1. Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., Timmusk, T., 2007. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res.*
2. Alberch, J., Lopez, M., Badenas, C., Carrasco, J.L., Mila, M., Munoz, E., Canals, J.M., 2005. Association between BDNF Val66Met polymorphism and age at onset in Huntington disease. *Neurology*
3. Anderson, K. D., Panayotatos, N., Corcoran, T. L., Lindsay, R. M. and Wiegand, S. J. (1996) Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
4. Arning L, Montè D, Hansen W, Wieczorek S, Jagiello P, Akkad DA, Andrich J, Kraus PH, Saft C, Epplen JT. ASK1 and MAP2K6 as modifiers of age at onset in Huntington's disease. *J Mol Med.* 2008
5. Bachoud-Lévi A, Gaura V, Brugières P, et al. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol* 2006
6. Bachoud-Lévi AC, Bourdet C, Brugières P, et al. Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease. *Exp Neurol* 2000
7. Bae, B. I., Hara, M. R., Cascio, M. B., Wellington, C. L., Hayden, M. R., Ross, C. A., Ha, H. C., Li, X. J., Snyder, S. H. and Sawa, A. (2006) Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
8. Baquet Z.C., Gorski J.A., Jones K.R., 2004. Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.*
9. Barinaga, M. (1994) Neurotrophic factors enter the clinic. *Science* 264, 772-774
10. Batchelor, P.E., Liberatore, G.T., Wong, J.Y., Porritt, M.J., Frerichs, F., Donnan, G.A., Howells, D.W., 1999. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.*
11. Beal, M.F., 1994. Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease. *Curr. Opin. Neurol.*
12. Bezprozvanny, I. and Hayden, M. R. (2004) Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
13. Binder, D.K., Scharfman, H.E., 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*
14. Bizat, N., Hermel, J. M., Humbert, S., Jacquard, C., Creminon, C., Escartin, C., Saudou, F., Krajewski, S., Hantraye, P. and Brouillet, E. (2003) *In vivo* calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J. Biol. Chem.*
15. Boado, R. J., Kazantsev, A., Apostol, B. L., Thompson, L. M. and Pardridge, W. M. (2000) Antisense-mediated down-regulation of the human huntingtin gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*
16. Bonelli RM, Mahner FA, Niederwieser G. Olanzapine for Huntington disease: an open label study. *Clin Neuropharmacol* 2002
17. Britton JW, Uitti RJ, Ahlskog JE, Robinson RG, Kremer B, Hayden MR. Hereditary late-onset chorea without significant dementia: genetic evidence for substantial phenotypic variation in Huntington's disease. *Neurology.* 1995
18. Canals JM, Checa N, Marco S., Akerud P., Michels, A., Perez-Navarro, E., Tolosa, E., Arenas, E., Alberch, J., 2001. Expression of brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons is regulated by striatal target area. *J. Neurosci.*
19. Canals, J.M., Marco, S., Checa, N., Michels, A., Perez-Navarro, E., Arenas, E., Alberch, J., 1998. Differential regulation of the expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 after excitotoxicity in a rat model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*
20. Canals, J.M., Pineda, J.R., Torres-Peraza, J.F., Bosch, M., Martin-Ibanez, R., Munoz, M.T., Mengod, G., Ernfor, P., Alberch, J., 2004. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.*
21. Cannella, M., Gellera, C., Maglione, V., Giallonardo, P., Cislighi, G., Muglia, M., Quattrone, A., Pierelli, F., Di Donato, S., Squitieri, F., 2004. The gender effect in juvenile Huntington disease patients of Italian origin. *Am. J. Med. Genet.*
22. Cattaneo, E., Conti, L., 1998. Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J. Neurosci. Res.*
23. Cattaneo, E., Zuccato, C. and Tartari, M. (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*
24. Cesaro, P. (2004) The design of clinical trials for cell transplantation into the central nervous system. *NeuroRx*
25. Chen, M., Ona, V. O., Li, M. et al. (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.*
26. Chen, Z.Y., Patel, P.D., Sant, G., Meng, C.X., Teng, K.K., Hempstead, B.L., Lee, F.S., 2004. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wildtype BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J. Neurosci.* 24, 4401-4411.
27. Chong SS, Almqvist E, Telenius H, LaTray L, Nichol K, Bourdelat-Parks B et al. Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington disease: evidence from single sperm analyses. *Hum Mol Genet* 6:301-309, 1997.
28. Choo, Y. S., Johnson, G. V., MacDonald, M., Detloff, P. J. and Lesort, M. (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.*
29. Chuang, D.M., 2004. Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Crit. Rev. Neurobiol.*
30. Cornejo-Olivas, Mario R, Inca Martinez, Miguel A. Clinical and molecular features of late onset Huntington Disease in a Peruvian Chort. *Journal of Huntington's disease.* Vol 4, N 1, pp 99-105, 2015
31. Cubo E, Shannon KM, Tracy D, et al. Effect of donepezil on motor and cognitive function in Huntington disease. *Neurology* 2006
32. Cummings JL, Cunningham K: Obsessive-compulsive disorders in Huntington's disease. *Biol Psychiatry* 1992
33. Cummings JL. Behavioral and psychiatric symptoms associated with Huntington's disease. In: Weiner WJ, Lang AE, eds. *Behavioral Neurology of movement disorders: Advances in Neurology*, vol. 65. New York: Raven Press, 1995.
34. Dedeoglu, A., Kubilus, J. K., Jeitner, T. M. et al. (2002) Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J. Neurosci.*
35. Del Toro, D., Canals, J.M., Gines, S., Kojima, M., Egea, G., Alberch, J., 2006. Mutant huntingtin impairs the post-Golgi trafficking of brain-derived neurotrophic factor but not its Val66Met polymorphism. *J. Neurosci.*
36. Dewhurst K, Oliver J, Trick KKLK et al. Neuro-psychiatric aspects of Huntington's disease. *Confina Neurol* 1969
37. Di Maio, Squitieri, Napolitano, Campanella, Trofatter, Conneally I. Onset symptoms in 510 patients with Huntington's disease *Med Genet* 1993
38. Di Maria, E., Marasco, A., Tartari, M., Ciotti, P., Abruzzese, G., Novelli, G., Bellone, E., Cattaneo, E., Mandich, P., 2006. No evidence of association between BDNF gene variants and age-at-onset of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.*

39. DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P. and Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*
40. DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A., et al., 1995. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*
41. Djoussé and Myers et al., Evidence for a modifier of onset age in Huntington disease linked to the HD gene in 4p16. *Neurogenetics*. 2004
42. Dragatsis, I., Levine, M. S. and Zeitlin, S. (2000) Inactivation of hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat. Genet.*
43. Dunnett, S. B., Carter, R. J., Watts, C. et al. (1998) Striatal transplantation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.*
44. Dunnett, S. B., Nathwani, F. and Bjorklund, A. (2000) The integration and function of striatal grafts. *Prog. Brain Res.*
45. Duyao, M. P., Auerbach, A. B., Ryan, A. et al. (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*
46. Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D. and Sharp, P. A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*
47. Dürr A, Hahn-Barma V, Brice A, Pêcheux C, Dodé C, Feingold J. Homozygosity in Huntington's disease. *J Med Genet.* 1999
48. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal 2003 *Cell Jan*
49. Eldadah, B. A. and Faden, A. I. (2000) Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J. Neurotrauma*
50. Eugen Kloster, Carsten Saft, Jörg T. Epplen, Larissa Arning. CNR1 variation is associated with the age at onset in Huntington disease. *European Journal of Medical Genetics* 56 (2013) 416 e 419
51. Farrer LA, Conneally MP. A genetic model for age at onset in Huntington disease. *Am J Hum Genet*
52. Faught E, Falgout MS, Leli DA. Late-onset variant of Huntington's chorea. *Southern Med J* 1983
53. Ferrer, I., Goutan, E., Marin, C., Rey, M.J., Ribalta, T., 2000. Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res.*
54. Fletcher, J.M., Hughes, R.A., 2006. Novel monocyclic and bicyclic loop mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *J. Pept. Sci.*
55. Freeman TB, Cicchetti F, Hauser RA, et al. Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000.
56. Freeman, T. B., Hauser, R. A., Willing, A. E., Zigova, T., Sanberg, P. R. and Saporta, S. (2000) Transplantation of human fetal striatal tissue in Huntington's disease: rationale for clinical studies. In *Novartis Foundation Symposia Neural Transplantation in Neurodegenerative Disease: Current Status and New Directions*,
57. Frontali M., Malaspina P, Rossi C, et al., Epidemiological and linkage studies on Huntington disease in Italy, *Hum Genet*, 1990
58. Fusco, F.R., Zuccato, C., Tartari, M., Martorana, A., De March, Z., Giampa, C., Cattaneo, E., Bernardi, G., 2003. Co-localization of brain-derived neuro-trophic factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolinic acid-lesioned rat brain. *Eur. J. Neurosci.*
59. Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., Saudou, F., 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*
60. Gervais, F. G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Metzler, M., Hackam, A. S., Tam, J., Vaillancourt, J. P., Houtzager, V., Rasper, D. M., Roy, S., Hayden, M. R. and Nicholson, D. W. (2002) Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat. Cell Biol.*
61. Graham, R. K., Deng, Y., Slow, E. J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., Warby, S. C., Doty, C. N., Roy, S., Wellington, C. L., Leavitt, B. R., Raymond, L. A., Nicholson, D. W. and Hayden, M. R. (2006) Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell*
62. Gray, M., Shirasaki, D., Cepada, C., Wilburn, B., Wu, H., Li, X., Li, S., Yang, X.W., Sun, Y.E., Levine, M.S., 2006. BAC transgenic models of Huntington's disease recapitulate phenotypic features of adult onset HD. In: *Proceedings of the 36th Annual Congress of the Society for Neuroscience*
63. Groppi C, Barontini F, Braco L, et al., Huntington Chorea : a prevalence study in the Florence area. *Acta Psych Scand*, 1986
64. Gunawardena, S., Goldstein, L.S., 2004. Cargo-carrying motor vehicles on the neuronal highway: transport pathways and neurodegenerative disease. *J. Neurobiol.*
65. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, et al.: A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*
66. Gusella, J., MacDonalds, M., 2002. No post-genetics era in human disease research. *Nat. Rev. Genet.*
67. Gutekunst, C. A., Li, S. H., Yi, H., Mulroy, J. S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R. J., Hersch, S. M. and Li, X. J. (1999) Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J. Neurosci.*
68. Hamilton JM, Murphy C, Paulsen JS: Odor detection, learning, and memory in Huntington's disease. *J Int Neuropsychol Soc.* 1999
69. Harper PS. *Huntington's Disease*. London: W.B. Saunders, 1996.
70. Harper, PS., 1991. *Huntington's Disease*. W.B. Saunders, London.
71. Hauser RA, Furtado S, Cimino CR, et al. Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *Neurology* 2002;
72. Hayden MR. *Huntington's Chorea*. New York: Springer-Verlag, 1981.
73. Hayden MR. *Huntington's chorea in South Africa*. University of Cape Town, 1979.
74. Hebb MO, Garcia R, Gaudet P, Mendez IM. Bilateral stimulation of the globus pallidus internus to treat choreathetosis in Huntington's disease: technical case report. *Neurosurgery* 2006
75. Hermel, E., Gafni, J., Propp, S.S., Leavitt, B.R., Wellington, C.L., Young, J.E., Hackam, A.S., Logvinova, A.V., Peel, A.L., Chen, S.F., Hook, V., Singaraja, R., Krajewski, S., Goldsmith, P.C., Ellerby, H.M., Hayden, M.R., Bredesen, D.E., Ellerby, L.M., 2004. Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ.*
76. Hmida-Ben Brahim D, Chourabi M, Ben Amor S, Trabelsi IHS, Haddaji-Mastouri, M, Gribaa, M, Sassi S, FE Gahbiche, Lamouchi T, Mougou-Zereli S, Ammou AB, and Saad A. Modulation at Age of Onset in Tunisian Huntington Disease. *Genetics Research International* Volume 2014, Article ID 210418, 5 pages
77. Hockly, E., Richon, V. M., Woodman, B. et al. (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
78. Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D. J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Li, X. J., Stevens, M. E., Rosemond, E., Roder, J. C., Phillips, A. G., Rubin, E. M., Hersch, S. M. and Hayden, M. R. (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*
79. Huntington Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on HD chromosomes. *Cell* 1993
80. Huntington Study Group (2001) A randomized, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. *Neurology*
81. Huntington Study Group (2003) Dosage effects of riluzole in Huntington's disease: a multicenter placebo-controlled study. *Neurology*
82. Huntington Study Group (2004) Minoocycline safety and tolerability in Huntington disease. *Neurology*

83. Huntington Study Group Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. *Mov Disord*, 1996;
84. International Huntington Association and World Federation of Neurology research group of Huntington's chorea. Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's disease. *Neurology* 1994;
85. Katoh-Semba, R., Asano, T., Ueda, H., Morishita, R., Takeuchi, I.K., Inaguma, Y., Kato, K., 2002. Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J*
86. Katoh-Semba, R., Takeuchi, I.K., Semba, R., Kato, K., 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J. Neurochem.* 69, 34–42.
87. Keene CD, Sonnen JA, Swanson PD, et al. Neural transplantation in Huntington's disease: long-term grafts in two patients. *Neurology* 2007;
88. Kehoe P, Krawczak M, Haroer SP, Owen MJ, Jones AL. Age of onset in Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length. *J Med Genet* 1999
89. Kendall, A. L., Hantraye, P. and Palfi, S. (2000) Striatal tissue transplantation in non-human primates. *Prog. Brain Res.*
90. Kim, M., Lee, H. S., LaForet, G., McIntyre, C., Martin, E. J., Chang, P., Kim, T. W., Williams, M., Reddy, P. H., Tagle, D., Boyce, F. M., Won, L., Heller, A., Aronin, N. and DiFiglia, M. (1999) Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *J. Neurosci.*
91. Kishikawa, S., Li, J.L., Gillis, T., Hakky, M.M., Warby, S., Hayden, M., Macdonald, M.E., Myers, R.H., Gusella, J.F., 2006. Brain-derived neurotrophic factor does not influence age at neurologic onset of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*
92. Kloster E, Saft C, Epplen JT. Association of age at onset in Huntington disease with functional promoter variations in NPY and NPY2R. *J Mol Med* (2014) 92:177–184
93. Kopyov, O. V., Jacques, S., Lieberman, A., Duma, C. M. and Eagle, K. S. (1998) Safety of intrastriatal neurotransplantation for Huntington's disease patients. *Exp. Neurol.*
94. Kordower, J. H., Isacson, O. and Emerich, D. F. (1999) Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? *Exp. Neurol.*
95. Koutsis G, Karadima G, Kladi A, Panas M. Late onset Huntington's disease: diagnostic and prognostic consideration. *Parkinsonism and related disorders* 20 (2014) 726-730.
96. Kremer, B., Clark, C. M., Almqvist, E. W. et al. (1999) Influence of lamotrigine on progression of early Huntington disease: a randomized clinical trial. *Neurology*
97. Kremer, B.; Squitieri, F.; Telenius, H.; Andrew, S. E.; Theilmann, J.; Spence, N.; Goldberg, Y. P.; Hayden, M. R. Molecular analysis of late onset Huntington's disease. *J. Med. Genet.* .
98. Laforet, G. A., Sapp, E., Chase, K., McIntyre, C., Boyce, F. M., Campbell, M., Cadigan, B. A., Warzecki, L., Tagle, D. A., Reddy, P. H., Cepeda, C., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Klapstein, G. J., Ariano, M. A., Levine, M. S., DiFiglia, M. and Aronin, N. (2001) Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J. Neurosci.*
99. Langbehn, Hayden, Paulsen. CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): A review and validation study of statistical approaches
100. Li, S. H., Gutekunst, C. A., Hersch, S. M. and Li, X. J. (1998) Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *J. Neurosci.*
101. Li, X. J., Li, S. H., Sharp, A. H., Nucifora, F. C. Jr, Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S. H. and Ross, C. A. (1995) A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature*
102. Lindvall, O. and Hagell, P. (2002) Cell replacement therapy in neurodegenerative disorders. *Clin. Neurosci. Res.*
103. Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H. et al. (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*
104. Liu, Q.R., Lu, L., Zhu, X.G., Gong, J.P., Shaham, Y., Uhl, G.R., 2006. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res.*
105. Liu, D., Chan, S.L., de Souza-Pinto, N.C., Slevin, J.R., Wersto, R.P., Zhan, M., Mustafa, K., de Cabo, R., Mattson, M.P., 2006. "Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress." *Neuromolecular Med.* 8, 389–414.
106. Liu, Q.R., Walther, D., Drgon, T., Poleskaya, O., Lesnick, T.G., Strain, K.J., de Andrade, M., Bower, J.H., Maraganore, D.M., Uhl, G.R., 2005. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*
107. Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N. L., Solano, S. M., Hollingsworth, Z. R., Menon, A. S., Frey, A. S., Spektor, B. S., Penney, E. B., Schilling, G., Ross, C. A., Borchelt, D. R., Tapscott, S. J., Young, A. B., Cha, J. H. and Olson, J. M. (2000) Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 9,
108. MacDonald ME, Gines S, Gusella JF, Wheeler VC. Huntington's disease. *Neuromolecular Med.* 2003
109. MacDonald, ME.; Vonsattel, J. P.; Shrinidhi, J.; Couropmitree, N. N.; Cupples, L. A.; Bird, E. D.; Gusella, J. F.; Myers, R. H. Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology* 1999.
110. Madrazo, I., Franco-Bourland, R. E., Castrejon, H., Cuevas, C. and Ostrosky-Solis, F. (1995) Fetal striatal homotransplantation for Huntington's disease: first two case reports. *Neurol. Res.*
111. Maglione V, Cannella M, Martino T, De Blasi A, Frati L, Squitieri F. The platelet maximum number of A2A-receptor binding sites (Bmax) linearly correlates with age at onset and CAG repeat expansion in Huntington's disease patients with predominant chorea. *Neurosci Lett.* 2006
112. Magnet MK, Kapfhammer HP, Bonelli RM. Cabergoline in Huntington's disease: the first case report. *Acta Neurol Scand* 2006
113. Mainini P, Lucci B, Guidetti D, et al., prevalenza della malattia di Huntington nelle province di Reggio Emilia e Parma, 1982
114. Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S.W., Bates, G.P., 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*
115. Marder K, Zhao H, Myers RH, Cudkowicz M, Kayson E, Kieburz K, Orme C, Paulsen J, Penney JB Jr, Siemers E, Shoulson I. Rate of functional decline in Huntington's disease. Huntington Study Group. *Neurology* 2000.
116. Marks, P. A., Richon, V. M., Miller, T. and Kelly, W. K. (2004) Histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.*
117. Marvanova, M., Lakso, M., Pirhonen, J., Nawa, H., Wong, G., Castren, E., 2001. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Mol. Cell. Neurosci.*
118. Masuda N, Goto J, Murayama N, Watanabe M, Kondo I, Kanazawa I Analysis of triplet repeats in the huntingtin gene in Japanese families affected with Huntington's disease *J Med Genet* 1995;
119. Matthews, R. T., Yang, L., Browne, S., Baik, M. and Beal, M. F. (1998) Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
120. Mende-Mueller, L. M., Toneff, T., Hwang, S. R., Chesselet, M. F. and Hook, V. Y. (2001) Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington's disease striatum. *J. Neurosci.* 21,

121. Mendez MF: Huntington's disease: update and review of neuropsychiatric aspects. *Int J Psychiatry Med* 1994;
122. Metzger S, Rong J, Nguyen HP, Cape A, Tomiuk J, Soehn AS, Propping P, Freudenberg-Hua Y, Freudenberg J, Tong L, Li SH, Li XJ, Riess O. Huntingtin-associated protein-1 is a modifier of the age-at-onset of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2006
123. Metzger, S., Bauer, P., Tomiuk, J., Laccone, F., Didonato, S., Gellera, C., Mariotti, C., Lange, H.W., Weirich-Schwaiger, H., Wenning, G.K., Seppi, K., Melegh, B., Havasi, V., Baliko, L., Wiczorek, S., Zaremba, J., Hoffman- Zacharska, D., Sulek, A., Basak, A.N., Soydan, E., Zidovska, J., Kebrdlova, V., Pandolfo, M., Ribai, P., Kadasi, L., Kvasnicova, M., Weber, B.H., Kreuz, F., Dose, M., Stuhmann, M., Riess, O., 2006b. Genetic analysis of candidate genes modifying the age-at-onset in Huntington's disease. *Hum. Genet.*
124. Mittoux, V., Joseph, J. M., Conde, F. et al. (2000) Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum. Gene Ther.*
125. Mizuta, I., Ohta, M., Ohta, K., Nishimura, M., Mizuta, E., Kuno, S., 2001. Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes. *Neurosci. Lett*
126. Morales LM, Estevez J, Suarez H, Villalobos R, Chacin de Bonilla L, Bonilla E. Nutritional evaluation of Huntington disease patients. *Am J Clin Nutr.* 1989.
127. Moro E, Lang AE, Strafella AP, et al. Bilateral globus pallidus stimulation for Huntington's disease. *Ann Neurol* 2004
128. Myers RH, Goldman D, Bird ED, et al. Maternal transmission in Huntington's disease. *Lancet* 1983
129. Myers RH, Leavitt J, Farrer LA, Jagadeesh J, McFarlane H, Mastromauro CA, Mark RJ, Gusella JF. Homozygote for Huntington disease. *Am J Hum Genet.* 1989
130. Myers RH, Madden JJ, Teague JL, Falek A: Factors related to onset age of Huntington disease. *Am J Hum Genet*
131. Myers RH, Sax DS, Schoenfeld M, et al. Late onset of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985;
132. Myers RH. Huntington's Disease Genetics. 2004 The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics
133. Nance MA, Myers RH, US Huntington's Disease Genetic Testing Group. 1999b. Trends in predictive and prenatal testing for Huntington's disease, 1993-1999. *Am J Hum Genet*
134. Nance MA, Myers RH. Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*
135. Nance MA. Clinical aspects of CAG repeat diseases. *Brain Pathol.* 1997
136. Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R. et al. (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*
137. Nazé P, Vuillaume I, Destée A, Pasquier F, Sablonnière B. Mutation analysis and association studies of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Huntington's disease. *Neurosci Lett.* 2002
138. O'Leary, Hughes, 2003. Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.*
139. Pearce, Heathfield Pearce. Valproate sodium in Huntington chorea. *Arch Neurol* 1977
140. Perez-Navarro, E., Canudas, A. M., Akerund, P., Alberch, J. and Arenas, E. (2000) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin- 4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J. Neurochem.*
141. Petersen, A. and Brundin, P. (1999) Effects of ciliary neurotrophic factor on excitotoxicity and calcium ionophore A23187-induced cell death in cultured embryonic striatal neurons. *Exp. Neurol.*
142. Petersen, A., Larsen, K. E., Behr, G. G., Romero, N., Przedborski, S., Brundin, P. and Sulzer, D. (2001) Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum. Mol. Genet.*
143. Petersen, A., Mani, K. and Brundin, P. (1999) Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. *Exp. Neurol.*
144. Puri, B. K., Leavitt, B. R., Hayden, M. R. et al. (2005) Ethyl-EPA in Huntington disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Neurology*
145. Ravina B, Romer M, Constantinescu R, Biglan K, Brocht A, Kiebertz K, Shoulson I, McDermott MP. The relationship between CAG repeat length and clinical progression in Huntington's disease. *Mov Disord.* 2008
146. Rosser, A. E. and Dunnett, S. B. (2003) Neural transplantation in patients with Huntington's disease. *CNS Drugs*
147. Sapp, E., Penney, J., Young, A., Aronin, N., Vonsattel, J. P. and DiFiglia, M. (1999) Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*
148. Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. and Greenberg, M. E. (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*
149. Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. and Greenberg, M. E. (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell.*
150. Schinder, A.F., Poo, M., 2000. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*
151. Sen, S., Nesse, R.M., Stoltenberg, S.F., Li, S., Gleiberman, L., Chakravarti, A., Weder, A.B., Burmeister, M., 2003. A BDNF coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression. *Neuropsychopharmacology.*
152. Shoulson et Fanh. 1979 Huntington disease: clinical care and evaluation. *Neurology.*
153. Simonin C, Duru C, Salleron J, Hincper P, Delval C, Youssov K Association between caffeine intake and age at onset in Huntington's disease. *REGISTRY Study of the European Huntington's Disease Network Neurobiology of Disease* 58 (2013) 179–182
154. Slow, E. J., Graham, R. K., Osmand, A. P., Devon, R. S., Lu, G., Deng, Y., Pearson, J., Vaid, K., Bissada, N., Wetzel, R., Leavitt, B. R. and Hayden, M. R. (2005) Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration *in vivo* despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
155. Squitieri F, Andrew SE, Goldberg YP, et al., DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanism of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence, *Hum Mol Genet*, 1994
156. Squitieri F, Berardelli A, Nargi E, Castellotti B, Mariotti C, Cannella M, Lavitrano ML, de Grazia U, Gellera C, Ruggieri S. Atypical movement disorders in the early stages Huntington's disease: clinical and genetic analysis. *Clin Genet.* 2000
157. Squitieri F, Cannella M, Gaudio L, Martino T, Maglione V, Giallonardo P, Simonelli M, Simonelli G, Mangeruga D, Ciarmiello A, Pierelli F. Italian Huntington disease patients--data and tissue bank. *Neurol Sci* 2003
158. Squitieri F, Cannella M, Sgarbi G, Maglione V, Falleni A, Lenzi P, Baracca A, Cislighi G, Saft C, Ragona G, Russo MA, Thompson LM, Solaini G, Fornai F. Severe ultrastructural mitochondrial changes in lymphoblasts homozygous for Huntington disease mutation. *Mech Ageing Dev.* 2006
159. Squitieri F, Cannella M, Simonelli M. CAG mutation effect on rate of progression in Huntington's disease. *Neurol Sci.* 2002
160. Squitieri F, Di Maio L, Boiano S, et al., epidemiology and molecular genetics of Huntington disease in Italy, *Abstr XIV World Congress of Neurology*, 1989
161. Squitieri F, Frati L, Ciarmiello A, Lastoria S, Quarell O, 2005. Juvenile Huntington's disease: does a dosage-effect pathogenic mechanism differ from the classic adult disease? *Mechanisms of Ageing and Development*
162. Squitieri F, Griguoli A, Capelli G, Porcellini A, D'Alessio B. *Clin Genet.* 2015 Epidemiology of Huntington disease: first post-HTT gene analysis of prevalence in Italy.
163. Squitieri F., M. Cannella, P. Giallonardo, V. Maglione, C. Mariotti and M. R. Hayden Onset and pre-onset studies to define the Huntington's disease natural history *Brain Research Bulletin*,
164. Squitieri, F.; Sabbadini, G.; Mandich, P.; Gellera, C.; Di Maria, E.; Bellone, E.; Castellotti, B.; Nargi, E.; de Grazia, U.; Frontali, M.; Novelletto, A. Family and molecular data for a fine analysis of age at onset in Huntington disease. *Am. J. Med. Genet.* 2000.

165. Sramka, M., Rattaj, M., Molina, H., Vojtassak, J., Belan, V. and Ruzicky, E. (1992) Stereotactic technique and pathophysiological mechanisms of neurotransplantation in Huntington's chorea. *Stereotact. Funct. Neurosurg.*
166. Steffan, J. S., Bodai, L., Pallos, J. et al. (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature (London)* **413**, 739–743
167. Symington GR, Leonard DP, Shannon PJ, Vajda FJ. Sodium valproate in Huntington's disease. *Am J Psychiatry* 1978;
168. Tardito, D., Perez, J., Tiraboschi, E., Musazzi, L., Racagni, G., Popoli, M., 2006. Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview. *Pharmacol. Rev.*
169. The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*
170. Trushina, E., Dyer, R.B., Badger II, J.D., Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemain, V., McPherson, P.S., Mandavilli, B.S., Van Houten, B., Zeitlin, S., McNiven, M., Aebersold, R., Hayden, M., Parisi, J.E., Seeberg, E., Dragatsis, I., Doyle, K., Bender, A., Chacko, C., McMurray, C.T., 2004. Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.*
171. Turner, C. and Schapira, A. H. (2001) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders and ageing.
172. Tuszynski, M. H. (2002) Growth-factor gene therapy for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.*
173. Walker DA, Harper PS, Wells CEC, et al. Huntington's chorea in south Wales: a genetic and epidemiological study. *Clin Genet* 1981;
174. Walzer Francis O, Huntington's disease. *Lancet* 2007;
175. Van Dellen, A., Deacon, R., York, D., Blakemore, C. and Hannan, A. J. (2001) Anterior cingulate cortical transplantation in transgenic Huntington's disease mice. *Brain Res. Bull.*
176. Van Dijk, van der Velde, Roos, Bruyn. Juvenile Huntington disease. *Hum Genet.* 1986
177. Wang, H., Deng, Y., Meade, C., Del Mar, N., Goldowitz, D., Reiner, A., 2006. Loss of BDNF mRNA expression in layer V cortical neurons in R6/2 mouse. In: Proceedings of the 36th Annual Congress of the Society for Neuroscience
178. Varani K, Rigamonti D, Sipione S, Camurri A, Borea PA, Cattabeni F, Abbracchio MP, Cattaneo E. Aberrant A2A receptor function in peripheral blood cells in Huntington's disease. *FASEB J.* 2001
179. Wei, H., Qin, Z.H., Senatorov, V.V., Wei, W., Wang, Y., Qian, Y., Chuang, D.M., 2001. Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience*
180. Wellington, C. L., Singaraja, R., Ellerby, L., Savill, J., Roy, S., Leavitt, B., Cattaneo, E., Hackam, A., Sharp, A., Thornberry, N., Nicholson, D. W., Bredesen, D. E. and Hayden, M. R. (2000) Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275, 19831–19838.
181. Went LN, Vegter-van der Vliis M, Bruyn GW. Paternal transmission in Huntington's disease. *Lancet* 1984;
182. Weydt P, Soyak SM, Wolfgang Patsch G and For the European. A single nucleotide polymorphism in the coding region of PGC-1 α is a male-specific modifier of Huntington disease age-at-onset in a large European cohort. *Huntington Disease Network. BMC Neurology* 2014,14:1
183. Wexler NS, Young AB, Tanzi RE, Travers H, Starosta-Rubinstein S, Penney JB, Snodgrass SR, Shoulson I, Gomez F, Ramos Arroyo MA, et al. Homozygotes for Huntington's disease. *Nature.* 1987
184. White, J. K., Auerbach, W., Duyao, M. P., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., Joyner, A. L. and MacDonald, M. E. (1997) Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat. Genet.* 17, 404–410. Widner, H., Brundin, P., Rehncrona, S. et al. (1991) Transplanted allogeneic fetal dopamine neurons survive and improve motor function in idiopathic Parkinson's disease. *Transplant. Proc.* **23**, 793–795
186. Wiegand et al., Nocturnal sleep in Huntington's disease. *J Neurol.* 1991 Jul;238(4):203-8.
187. Zhang, Y., Li, M., Drozda, M., Chen, M., Ren, S., Mejia Sanchez, R.O., Leavitt, B.R., Cattaneo, E., Ferrante, R.J., Hayden, M.R., Friedlander, R.M., 2003. Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases. *J. Neurochem.* 87, 101–106.
188. Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., Timmusk, T., Sipione, S., Cattaneo, E., 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293, 493–498.
189. Zuccato, C., Liber, D., Ramos, C., Tarditi, A., Rigamonti, D., Tartari, M., Valenza, M., Cattaneo, E., 2005a. Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol. Res.* 52, 133–139.
190. Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Timmusk, T., Rigamonti, D., Cattaneo, E., 2003. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat. Genet.* 35, 76–83.