



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE

*Direttore: Ch.mo Prof. Raffaele De Caro*

UOC CLINICA NEUROLOGICA

*Direttore: Ch.mo Prof. Maurizio Corbetta*

TESI DI LAUREA

## **Caratterizzazione fenotipica e molecolare di una coorte di pazienti affetti da malattia di Parkinson associata a mutazioni di GBA: focus sulla sintomatologia disautonomica**

Relatore: Prof. Angelo Antonini

Correlatore: Dr.ssa Miryam Carecchio

Laureanda: Eleonora Bertoncello

Anno Accademico 2021/2022



# SOMMARIO

<b>1) RIASSUNTO .....</b>	<b>1</b>
1.1 BACKGROUND O PRESUPPOSTI DELLO STUDIO.....	1
1.2 SCOPO DELLO STUDIO .....	1
1.3 MATERIALI E METODI.....	1
1.4 RISULTATI.....	2
1.5 CONCLUSIONI .....	2
<b>1) ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
2.1 BACKGROUND .....	3
2.2 AIM OF THE STUDY .....	3
2.3 MATERIALS AND METHODS .....	3
2.4 RESULTS .....	4
2.5 CONCLUSIONS.....	4
<b>2) INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
2.1 LA MALATTIA DI PARKINSON .....	5
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	5
2.1.2 PATOGENESI.....	6
2.1.2.1 Meccanismo patogenetico e fattori di rischio .....	6
2.1.2.2 Funzionamento del sistema dopaminergico.....	7
2.1.2.3 Teorie sulla diffusione dell' $\alpha$ -sinucleina.....	8
2.1.3 SINTOMATOLOGIA.....	11
2.1.3.1 Fase prodromica.....	11
2.1.3.2 Sintomatologia motoria .....	11
2.1.3.3 Sintomatologia non motoria.....	12
2.1.4 DIAGNOSI.....	14
2.1.4.1 Anamnesi ed esame obiettivo .....	14
2.1.4.2 Tecniche di imaging.....	15
2.1.4.3 Diagnosi differenziale.....	16
2.1.5 TRATTAMENTO.....	17
2.1.5.1 Terapia della componente motoria .....	17
2.1.5.2 Terapia della componente non motoria .....	18

2.2 DISAUTONOMIA NELLA MALATTIA DI PARKINSON.....	19
2.2.1 APPARATO CARDIOCIRCOLATORIO .....	19
2.2.1.1 Ipotensione ortostatica .....	19
2.2.1.2 Ipertensione supina.....	21
2.2.1.3 Ipotensione postprandiale.....	21
2.2.2 APPARATO DIGERENTE .....	21
2.2.2.1 Scialorrea.....	22
2.2.2.2 Disfagia .....	22
2.2.2.3 Gastroparesi.....	22
2.2.2.4 Disfunzione intestinale.....	22
2.2.3 APPARATO URINARIO.....	23
2.2.4 APPARATO RIPRODUTTORE.....	24
2.2.5 TERMOREGOLAZIONE.....	24
2.3 MALATTIA DI PARKINSON GENETICA.....	25
2.3.1 SNCA .....	25
2.3.2 PINK, PRKN E FBXO7.....	25
2.3.3 GENI SECONDARI.....	26
2.4 MUTAZIONI DI GBA <sup>21</sup> .....	27
2.4.1 EPIDEMIOLOGIA .....	27
2.4.2 RUOLO DEL GENE .....	28
2.4.3.1 Patogenesi .....	29
2.4.3.2 Tipologie .....	30
2.4.4 MALATTIA DI PARKINSON ASSOCIATA A MUTAZIONI DI GBA ..	31
2.4.4.1 Patogenesi .....	31
2.4.4.2 Mutazioni .....	34
2.4.4.3 Proposte terapeutiche .....	35
2.4.4.4 Clinica della M. di Parkinson associata a mutazioni di GBA .....	36
2.4.4.5 Impatto delle diverse mutazioni .....	38
2.4.4.6 Imaging della malattia di Parkinson associata a mutazioni di GBA <sup>36</sup>	
.....	41
2.4.5 DEMENZA A CORPI DI LEWY E RBD.....	42
<b>3) SCOPO DELLO STUDIO.....</b>	<b>43</b>
<b>4) MATERIALI E METODI .....</b>	<b>45</b>

4.1 ANALISI GENETICA.....	45
4.1.1 NEXT GENERATION SEQUENCING .....	45
4.2 ANALISI CLINICA.....	46
4.2.1 ANALISI DELLE CARATTERISTICHE MOTORIE .....	46
4.2.2 ANALISI DELLE CARATTERISTICHE NON MOTORIE.....	47
4.2.2.1 Valutazione neuropsicologica.....	47
4.2.3 CONFRONTO IN BASE ALLA SEVERITA' DELLE MUTAZIONI.....	48
4.2.4 CONFRONTO PD-GBA CON PAZIENTI GENETICAMENTE NEGATIVI.....	48
4.2.5 VALUTAZIONE DELLA DISAUTONOMIA: LA SCALA COMPASS 31 .....	49
4.2.6 CONFRONTO GBA-PD VS PARKINSON IDIOPATICO.....	51
<b>5) RISULTATI .....</b>	<b>53</b>
5.1 DESCRIZIONE DELLA COORTE DI PAZIENTI CON MUTAZIONE DI GBA 53	
5.1.1 CARATTERISTICHE GENERALI .....	53
5.1.2 DESCRIZIONE GENETICA E MOLECOLARE.....	54
5.1.3 DESCRIZIONE FENOTIPICA: ASPETTI MOTORI.....	56
5.1.4 DESCRIZIONE FENOTIPICA: ASPETTI NON MOTORI.....	56
5.1.5 CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO IN BASE ALLA SEVERITA' DELLA MUTAZIONE.....	58
5.2 CONFRONTO TRA PAZIENTI CON MUTAZIONE DI GBA E PAZIENTI CON TEST GENETICO NEGATIVO .....	58
5.2.1 VARIABILI DI CARATTERE MOTORIO .....	59
5.2.2 VARIABILI DI CARATTERE NON MOTORIO .....	61
5.2.2.1 Confronto sulla disautonomia.....	62
5.3 CONFRONTO TRA PAZIENTI CON MUTAZIONE DI GBA E MALATTIA DI PARKINSON IDIOPATICA AD ESORDIO TARDIVO .....	63
5.3.1 VARIABILI DI CARATTERE MOTORIO .....	64
5.3.2 VARIABILI DI CARATTERE NON MOTORIO .....	65
5.3.2.1 Confronto sulla disautonomia.....	66
<b>6) DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....</b>	<b>67</b>
<b>7) BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>79</b>



## 1) RIASSUNTO

### 1.1 BACKGROUND O PRESUPPOSTI DELLO STUDIO

La malattia di Parkinson (MP) è il disturbo del movimento neurodegenerativo più diffuso e ha un importante impatto di carattere medico e sociale. Numerosi studi sono stati svolti per raggiungere una completa conoscenza della patogenesi di questa malattia multifattoriale, arrivando a metterne in luce i principali fattori di rischio, tra i quali l'età avanzata e la predisposizione genetica. Il gene GBA, codificante per l'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi, di cui mutazioni bialleliche causano la malattia di Gaucher, è ritenuto ad oggi il più importante fattore di rischio genetico per lo sviluppo della MP.

Un ampio studio multicentrico italiano del 2020 ha evidenziato una significativa frequenza mutazionale del gene GBA (14,3%) in pazienti affetti da MP nel nostro paese. Tuttavia, la prevalenza di mutazioni di GBA nel Nord-Est d'Italia non è nota in quanto nessun centro di quest'area era stato incluso nel suddetto studio.

### 1.2 SCOPO DELLO STUDIO

Caratterizzare una coorte di pazienti affetti da MP con mutazioni del gene GBA che afferiscono all'Azienda Ospedaliera Università di Padova, per valutare se le loro caratteristiche cliniche e genetiche siano in linea con i risultati dei precedenti studi e se sia possibile differenziare clinicamente questa forma di malattia da quella idiopatica.

### 1.3 MATERIALI E METODI

20 pazienti affetti da MP con evidenza di mutazioni del gene GBA sono stati arruolati effettuando una fenotipizzazione clinica dettagliata tramite scale di valutazione motoria e non motoria. In particolare, i pazienti sono stati sottoposti ad un questionario per la valutazione della disautonomia validato dalla Mayo Clinic (COMPASS 31). I risultati sono stati confrontati con quelli di una coorte, appaiata per sesso, età e durata di malattia, composta da pazienti affetti da MP idiopatica sottoposti a test genetico risultato negativo, e con una coorte di pazienti con malattia

idiopatica ad esordio tardivo e con familiarità negativa (pertanto non sottoposti a test genetico) e durata di malattia prolungata.

## 1.4 RISULTATI

La frequenza mutazionale nel gene GBA nella popolazione in studio è risultata pari a 11,76%, sostanzialmente in linea con il precedente unico dato disponibile a livello italiano. I pazienti con mutazioni di GBA mostrano un esordio di malattia precoce (media 45,2 anni); nel 35% dei casi è rilevabile anamnesticamente una storia familiare positiva per MP o per patologie correlate. La malattia si presenta con fenotipo di tipo bradicinetico-rigido nel 65% dei casi, spesso accompagnato da complicanze motorie e non motorie, quali i disturbi cognitivi (75%), psichiatrici (80%) e disautonomici. La comparazione con i gruppi di controllo conferma una maggiore severità connessa alle mutazioni di GBA in ambito cognitivo ( $p1=0,0003$  e  $p2=0,0002$ ), di progressione di malattia (Hoehn & Yahr: 2,54,  $p1=0,00988$  e  $p2=0,02852$ ) e disautonomico, come confermato in questo caso dai punteggi in media più alti alla scala COMPASS 31 (34,12400723 in media,  $p=0,03662$ ).

Le mutazioni più frequentemente riscontrate sono state la N370S, rilevata in 9 pazienti della coorte, e la D409H, rilevata 4 volte, che sono rispettivamente classificate come di tipo mild e severo in relazione alla residua attività enzimatica di GBA. Altre mutazioni molto frequenti in letteratura riscontrate anche nella nostra coorte sono la L444P e la IVS2+1, entrambe severe.

## 1.5 CONCLUSIONI

La frequenza mutazionale ed i risultati dello studio sono in linea con quanto evidenziato dalla letteratura e indicano che la MP legata a mutazioni del gene GBA è caratterizzata da aspetti peculiari rispetto alle forme sporadiche, con maggiore impatto della sintomatologia cognitiva e disautonomica e di disturbi non motori che incidono significativamente sulla qualità di vita dei pazienti. La diagnosi di questa forma specifica di MP è importante non solo per motivi prognostici ma anche per possibili futuri risvolti terapeutici di medicina di precisione.



# 1) ABSTRACT

## 2.1 BACKGROUND

Parkinson's disease (PD) is the most common type of neurodegenerative movement disorder and causes both a medical and a social burden.

Extensive research has been carried out over the years in order to achieve a complete knowledge of the pathogenesis of this multifactorial disease and, nowadays, it has been demonstrated that old age and genetic predisposition are two of the most relevant risk factors.

GBA, a gene coding for the lysosomal enzyme glucocerebrosidase, whose biallelic mutations cause Gaucher disease, is considered to date the most important genetic risk factor for the development of PD.

A large multicentric study carried out in 2020 in Italy revealed a significant prevalence of monoallelic variants of GBA (14,3%) in PD patients. However, the mutational frequency of GBA in North-East of Italy is unknown, since no centres of this area were included in the above-mentioned study.

## 2.2 AIM OF THE STUDY

To characterise a cohort of patients with GBA-related PD followed at Azienda Ospedaliera Università di Padova, in order to determine if their clinical and genetic features parallel the results of previous studies and if it is possible to discriminate GBA-related PD from idiopathic PD on the basis of clinical phenotype and additional features.

## 2.3 MATERIALS AND METHODS

20 patients with PD and evidence of mutations of GBA on genetic testing were included in this study. Different mutations were classified according to their pathogenicity and deep clinical phenotyping was performed by means of motor and non-motor dedicated assessment scales.

Patients were administered a questionnaire drafted by the Mayo Clinic (COMPASS 31). The results were compared with a cohort of early-onset genetically negative

patients with PD from the same centre. The control group of patients was matched for age, sex and disease duration. Lastly, the results were compared with a second control group of patients with idiopathic PD with late onset, no significant family history and long disease duration, who were not genetically tested.

## 2.4 RESULTS

The calculated mutational frequency of GBA gene in our cohort was 11,76%, grossly in line with the only study assessing it in Italy. Patients with GBA-related Parkinson's disease showed an early onset (average age of onset 45,2 years), with a positive family history of PD or related pathologies in 35% of cases. A bradykinetic-rigid presentation was observed in 65% of cases who also displayed motor and non-motor complications over disease course, such as cognitive decline (75%), psychiatric disturbances (80%) and dysautonomia. The comparison between this cohort and the two control groups demonstrated a higher degree of severity of the GBA-related PD in terms of cognitive symptoms ( $p1=0,0003$  and  $p2=0,0002$ ), disease progression (Hoehn & Yahr: 2,54,  $p1=0,00988$  and  $p2=0,02852$ ) and dysautonomia, as confirmed by the higher average scores of COMPASS 31 scale (34,12400723 on average,  $p=0,03662$ ).

The most common mutations in our cohort were the N370S, which was detected in 9 patients, and D409H, detected in 4 patients, categorised as mild and severe, respectively, based on the residual GBA enzymatic activity. Other previously reported mutations in our cohort, were the L444P and the IVS2+1, both severe.

## 2.5 CONCLUSIONS

The mutational frequency of GBA gene and our results are in line with previous research and demonstrate that GBA-related PD has peculiar features compared to idiopathic, genetically-undetermined forms, particularly regarding cognitive and dysautonomic symptoms, two non-motor features which strongly affect quality of life. The diagnosis of this form of PD is important not only for prognostic reasons, but also for future possible therapeutic implications in the field of precision medicine.

## 2) INTRODUZIONE

### 2.1 LA MALATTIA DI PARKINSON

#### 2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

La malattia di Parkinson rappresenta il disturbo del movimento neurodegenerativo più frequente e colpisce lo 0,3% della popolazione generale, raggiungendo una prevalenza pari a circa l'1% nei soggetti con età maggiore di 60 anni ed il 3% nelle persone di età superiore agli 80 anni<sup>1</sup>.

L'incidenza di malattia, secondo una review pubblicata nel 2020 sullo "European Journal of Neurology", si attesta intorno a 8-18/100.000 persone all'anno. In Europa la prevalenza è stimata intorno a 65-12.500/100.000, mentre l'incidenza è pari a 5-346/100.000/anno<sup>1</sup>.

Considerato l'aumento progressivo dell'età media della popolazione globale, si presuppone che la prevalenza di tale malattia sia destinata ad aumentare, raddoppiando, secondo le stime, nelle prossime due decadi.<sup>2</sup> Nel 2016 si stimava<sup>3</sup> una prevalenza mondiale pari a 6,1 milioni, raddoppiata rispetto ai valori riscontrati negli anni '90, a causa del miglioramento delle metodologie diagnostiche, dell'aumentata aspettativa di vita e, in misura minore, dell'esposizione ambientale a determinate sostanze di origine industriale.

La malattia di Parkinson, inoltre, è leggermente più comune nel sesso maschile, con un rapporto M:F pari a 1,4:1<sup>3</sup>.

Nonostante il decorso cronico e progressivo della patologia, tuttavia, la morte dei pazienti parkinsoniani non è generalmente dovuta alla malattia, eccetto che nei casi di polmonite da aspirazione, ma è piuttosto determinata dalle medesime cause di morte dei pazienti non parkinsoniani.

## 2.1.2 PATOGENESI

### 2.1.2.1 Meccanismo patogenetico e fattori di rischio

La sua patogenesi si fonda principalmente sulla perdita dei neuroni dopaminergici della pars compacta della substantia nigra che determina alterazioni nei circuiti neuronali, tra cui in primis la via nigrostriatale. Questo processo procede di pari passo con l'accumulo a livello neuronale dei corpi di Lewy, strutture intracitoplasmatiche contenenti agglomerati anomali di  $\alpha$ -sinucleina, proteina molto diffusa nel sistema nervoso, e talvolta dei meno noti neuriti di Lewy, anormali strutture fusiformi composte da materiale granulare ed accumuli di  $\alpha$ -sinucleina. Tuttavia, la degenerazione dopaminergica si realizza anche in porzioni del sistema nervoso ulteriori rispetto alla substantia nigra, quali i nuclei motori dorsali del vago e del glossofaringeo, la zona reticolare intermedia, la formazione reticolare, i nuclei del rafe, il locus coeruleus, il nucleo gigantocellulare, parte del talamo, dell'amigdala e della neocortex; il coinvolgimento delle strutture citate, come verrà analizzato in seguito, sembra essere correlato alla comparsa dei numerosi sintomi, motori e non motori, che caratterizzano questa malattia.<sup>4</sup>

L' $\alpha$ -sinucleina è una proteina fisiologicamente presente a livello presinaptico ma anche esternamente al sistema nervoso, per esempio nel fegato, nei muscoli, nei linfociti e nei globuli rossi.<sup>2</sup>

In presenza di alcuni fattori di rischio o in maniera idiopatica, tuttavia, l' $\alpha$ -sinucleina tende ad assemblarsi in maniera errata, determinando aggregati di fibrille a foglietto beta insolubili che costituiscono i corpi e i neuriti di Lewy e che, accumulandosi, causano l'alterazione della funzionalità mitocondriale, lisosomiale, proteasomiale, sinaptica, citoscheletrica e di membrana delle cellule neuronali, determinandone la degenerazione. Un ruolo di rilievo nel favorire l'aggregazione sembra spettare alle modifiche post-traduzionali a carico dei residui della proteina in questione, quali fosforilazione, ossidazione e nitrificazione.

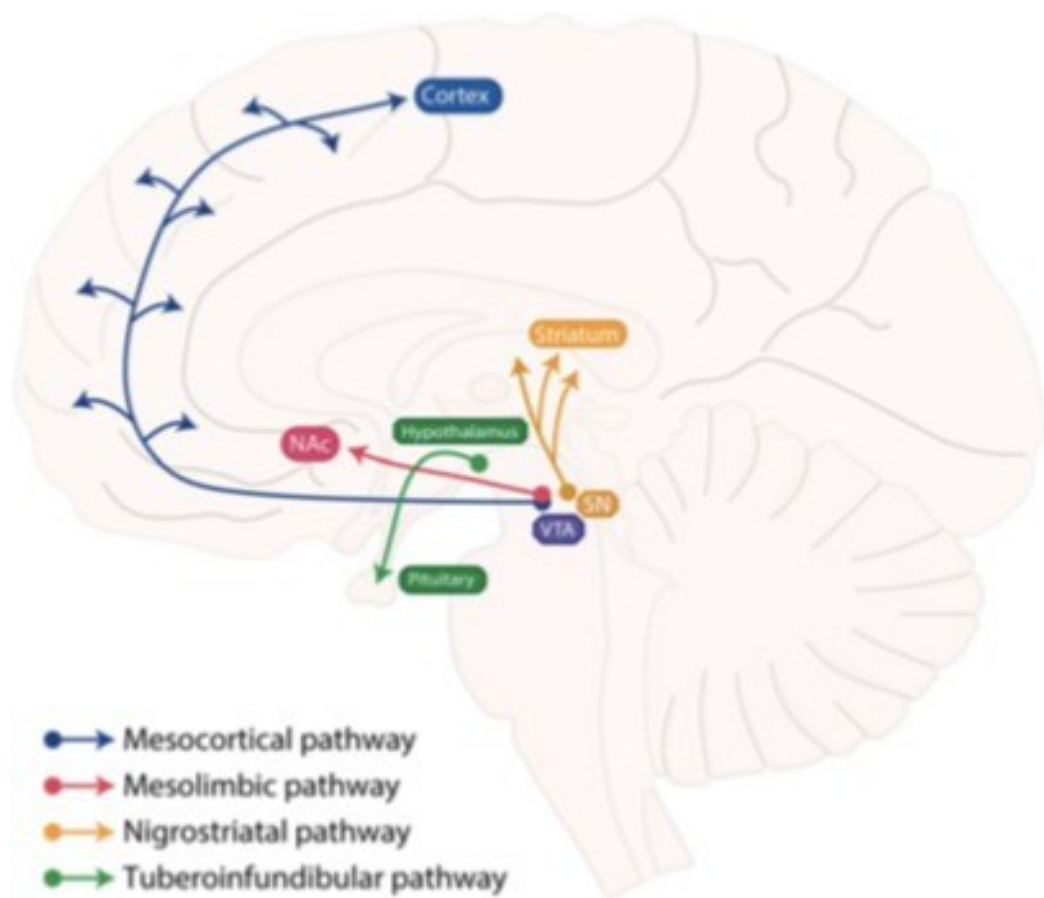
Tra i fattori di rischio che si possono enumerare, il principale è l'età; a questa si aggiungono il sesso maschile, l'esposizione ad alcuni fattori ambientali, per esempio alcuni pesticidi o metalli<sup>2</sup>, e la predisposizione genetica o familiare: avere

un parente di primo grado affetto da questa patologia incrementa il rischio di ammalarsi di due/tre volte rispetto alla popolazione generale.

Quando i diversi fattori di rischio si sommano, generando la malattia di Parkinson idiopatica o ereditaria, ciò che si verifica è dunque un accumulo anomalo di  $\alpha$ -sinucleina che va a determinare un danno a carico del sistema dopaminergico.

### 2.1.2.2 Funzionamento del sistema dopaminergico

Figura 1: Principali pathway dopaminergiche nel SNC<sup>5</sup>



Il danno causato dall'accumulo di proteina anomala si rende manifesto per esempio nel circuito dei gangli della base a livello della pathway nigrostriatale<sup>5</sup> (Figura 1), deputata al controllo della performance motoria e della motivazione che ne regola l'avvio e il mantenimento e suddivisa a sua volta in una via diretta, facilitatoria, e una via indiretta, inibitoria. La coesistenza di queste due vie è volta a mantenere una situazione di equilibrio tra attivazione e inibizione dell'organismo, mentre la

funzione della dopamina come neurotrasmettitore è quella di favorire i meccanismi propositivi di attivazione, promuovendo la via diretta a scapito di quella indiretta. Nel primo caso, fisiologicamente, la dopamina rilasciata dalla pars compacta della substantia nigra agisce positivamente sui neuroni del corpo striato dotati di recettori D1, permettendo a questi ultimi di inibire il globo pallido interno e la pars reticulata della substantia nigra e garantendo dunque l'attivazione del segnale talamo-corticale che promuove il movimento. Nel secondo caso, invece, la dopamina agisce sui neuroni striatali con recettori D2 inibendoli e impedendo che essi vadano ad inattivare il globo pallido esterno; questo, attivato, può dunque spegnere il nucleo subtalamico e di conseguenza il globo pallido interno, generando anche in questo caso una segnalazione talamo-corticale.

Ciò che accade invece in presenza di malattia di Parkinson e quindi di riduzione di mediatore dopaminergico è il verificarsi di una diminuzione della pathway diretta e di un aumento di attività di quella indiretta, determinanti una perdita del drive facilitatorio e la persistenza di uno stato inibitorio di base che si rende manifesto nel rallentamento tipico dei pazienti affetti.

#### 2.1.2.3 Teorie sulla diffusione dell' $\alpha$ -sinucleina

Secondo la teoria di Braak<sup>4</sup>, formulata nel 2003 a partire da studi autoptici, gli accumuli di  $\alpha$ -sinucleina non si distribuiscono in maniera casuale, bensì seguendo uno schema prefissato, il quale, correlando parallelamente all'evoluzione clinica della patologia, permette di suddividere il decorso in sei stadi. Nello stadio più lieve di malattia (stadio 1) le inclusioni si riscontrano unicamente a livello del bulbo, precisamente a livello dei nuclei motori dorsali del nervo vago e glossofaringeo, della zona reticolare intermedia, del nucleo olfattivo anteriore e del bulbo olfattivo. Nello stadio 2, invece, all'inasprirsi della localizzazione nelle zone precedentemente citate si somma la disposizione, a livello del tegmento pontino, a carico del nucleo caudale del rafe, del nucleo gigantocellulare reticolare e del complesso ceruleo-subceruleo, coinvolti nel circuito della ricompensa implicato nell'azione motoria. Il coinvolgimento di queste porzioni va via via peggiorando con la progressione agli stadi successivi. Nello stadio 3, inoltre, si verifica un iniziale danno mesencefalico a carico dei neuroni pigmentati della pars compacta della substantia nigra, in particolare nelle sue porzioni posterolaterale e

posteromediale (e dei nuclei magnocellulari del prosencefalo basale), senza tuttavia alcun interessamento corticale ad eccezione delle regioni connesse con le strutture olfattive; nello stadio 4, invece, la distruzione della substantia nigra diventa di calibro tale da rendere macroscopicamente manifesta la depigmentazione locale, e si verifica una diffusione patologica a scapito delle strutture prosencefaliche, ipotalamiche, talamiche e limbiche (amigdala e ippocampo, tra le altre). Sempre in questo stadio, accanto al danno della corteccia coinvolta nei processi olfattivi, subentra il vero e proprio interessamento corticale, con lo sviluppo di lesioni nella porzione mesocorticale anteromediale temporale, segno patognomonico del quarto stadio di malattia, e nella allocorteccia.

Sebbene, dunque, la distruzione della pars compacta della substantia nigra sia il tratto caratteristico della malattia di Parkinson, essa non è la prima regione cerebrale ad essere coinvolta, motivo per cui l'assenza di lesioni in tale sede non permette di escludere la presenza di un danno in regioni differenti.

Lo stadio 5 e lo stadio 6, i più avanzati, vedono invece l'espansione ulteriore del danno subito dalle strutture sottocorticali, mesocorticali e allocorticali e il grave interessamento della neocorteccia, parallelamente ad un inasprimento della sintomatologia, non più solo motoria, ma anche cognitiva, che caratterizza le fasi terminali della malattia di Parkinson. Nello specifico, nello stadio 5 le porzioni colpite a livello neocorticale sono le aree associative sensoriali, insulari, la corteccia cingolata anteriore e le aree prefrontali; nell'ultimo stadio, invece, quasi l'intera neocorteccia viene danneggiata, con anche lievi alterazioni delle aree premotorie, associative sensoriali di primo ordine, sensitive primarie e dell'area motoria primaria.

Sembra che la diffusione degli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina si verifichi secondo una modalità definibile "prion-like"<sup>6</sup> mediante trasporto attraverso quei neuroni, tra loro interconnessi in circuiti nervosi, ancora parzialmente intatti.

Questa ipotesi patogenetica, analizzata nell'ambito di numerosi studi in vivo e in vitro, non rappresenta tuttavia l'unica valida interpretazione alla base dello sviluppo della malattia di Parkinson, bensì uno dei molti meccanismi coinvolti nell'eziopatogenesi di questa malattia multifattoriale, insieme alla disfunzione mitocondriale, all'inefficienza dei sistemi scavenger, allo stress ossidativo e alla neuroinfiammazione. Sembra che sia proprio la concomitante disfunzione dei

sistemi appena citati, dovuta all'invecchiamento, ad alterazioni genetiche o a fattori ambientali, a sostenere l'incipit dell'accumulo dell' $\alpha$ -sinucleina anomala. Il trasferimento di monomeri proteici anomali (*aggregation-prone*) da un neurone all'altro stimola la progressiva agglomerazione di questi elementi a formare aggregati patologici insolubili. La velocità di tale disseminazione patologica non è la medesima in ogni individuo, ma è caratterizzata da un'importante variabilità interindividuale, al pari della rapidità di insorgenza dei vari sintomi, e potrebbe esser correlata ad alcune caratteristiche chimico-biologiche degli specifici aggregati che si vengono a creare. In particolare, potrebbero essere alcuni specifici amminoacidi a determinare non solo le modalità e i tempi di diffusione, ma anche il tipo di sinucleinopatia che si manifesta (Malattia di Parkinson, Demenza a Corpi di Lewy ed Atrofia Multisistemica).<sup>6</sup>

Ultimamente nella patogenesi della malattia di Parkinson molto risalto viene dato al ruolo dell'intestino<sup>7</sup> e dell'"asse intestino-cervello", inteso come un collegamento bidirezionale tra sistema nervoso centrale e sistema nervoso enterico: si pensa che in una prima fase l'accumulo di  $\alpha$ -sinucleina possa iniziare a livello del sistema nervoso enterico, con un potenziale ruolo metabolico del microbiota, in grado di impattare sulla sintesi e il metabolismo della dopamina, di determinare infiammazione e disregolazione immunitaria e di alterare la permeabilità intestinale. Si suppone infatti che gli aggregati, indotti da uno o più trigger esterni, possano localizzarsi inizialmente a livello del plesso nervoso intramurale, per poi diffondersi per via retrograda assonale alle terminazioni parasimpatiche vagali e da lì al nucleo dorsale del vago; in alternativa, gli accumuli patologici, a partire dal sistema nervoso enterico, potrebbero migrare verso i neuroni pregangliari simpatici del nucleo intermediolaterale del midollo spinale e da qui al tronco encefalico. Allo stesso modo, non si esclude che la trasmissione possa iniziare a livello delle strutture olfattive in direzione dell'amigdala e del locus coeruleus.

Per quanto il ruolo del microbiota del tratto gastrointestinale nella malattia di Parkinson sia ancora piuttosto vago, si pensa che esso, con le sue alterazioni, possa contribuire sia all'avvio che alla prosecuzione della patologia ed influenzarne il trattamento interferendo con l'assunzione dei farmaci<sup>8</sup>.



## 2.1.3 SINTOMATOLOGIA

### 2.1.3.1 Fase prodromica

Questo schema progressivo ascendente caudo-rostrale sembra correlarsi con l'evoluzione della sintomatologia tipica del Parkinson e con l'esistenza, spesso constatabile, di una fase prodromica che precede di anni la diagnosi della patologia, al momento della quale si stima siano già stati persi circa il 60% dei neuroni dopaminergici, e di numerosi sintomi non motori, non sufficientemente comprensibili in un quadro di pura disfunzione dopaminergica.

Dal punto di vista clinico, infatti, i sintomi tipici della malattia possono essere anticipati da sintomi prodromici quali principalmente iposmia, depressione, stipsi e disordini del sonno REM, ma anche ansia, alterazioni visive e disturbi disautonomici.

Successivamente compaiono i sintomi della malattia vera e propria: questi sono di carattere motorio e non motorio e si manifestano in maniera varia, sia per intensità che per incidenza, nei diversi pazienti.

### 2.1.3.2 Sintomatologia motoria

I principali sintomi motori<sup>9</sup> sono il tremore, la rigidità (evidenziabile per esempio come segno della troclea a livello del gomito) e la bradicinesia, con le sue varianti ipocinesia e acinesia: questi hanno tipicamente un esordio asimmetrico unilaterale, dal lato opposto rispetto ai gangli della base alterati, ma possono poi estendersi bilateralmente, mantenendo eventualmente una leggera predominanza monolaterale.

La bradicinesia è intesa come lentezza del movimento e progressiva riduzione di velocità e ampiezza - quest'ultima caratteristica distintiva del parkinsonismo - di movimenti continui e ripetuti all'esame neurologico e si esprime nella quotidianità in un rallentamento motorio globale. Viene comunemente testata mediante manovre di finger tapping, toe tapping, foot tapping e prono-supinazione<sup>10</sup>.

La rigidità è descritta, invece, come una resistenza involontaria e velocità-indipendente al movimento passivo di un'articolazione effettuato dall'esaminatore,

viene definita a tubo di piombo e spesso si associa al segno della troclea dentata a livello del gomito<sup>10</sup>.

Per quanto riguarda il tremore, infine, generalmente il paziente parkinsoniano lamenta un tremore a riposo con frequenza 4-6 Hz<sup>3</sup> a carico delle estremità distali degli arti, in particolare a carico di pollice e indice nella modalità comunemente definita “contar monete” (*pill-rolling*)<sup>11</sup>. Tuttavia, si può riscontrare anche tremore a livello del capo o, più raramente, tremore di tipo posturale o cinetico.

Altri disturbi motori sono l'instabilità posturale con incrementato rischio di cadute e fratture e le anomalie posturali, tra cui l'atteggiamento camptocormico e la Pisa syndrome, invalidanti caratteristiche tipiche degli stadi avanzati di malattia, i disturbi della marcia (freezing del cammino, esitazione e festinazione della marcia), la micrografia, la facies ipomimica e la riduzione dei movimenti oculari.

Il freezing, o blocco motorio, avviene più tipicamente a livello della marcia e può essere risolto grazie a clues visivi, ma può anche colpire la parola, l'apertura degli occhi o la scrittura.<sup>11</sup>

In merito alla marcia, il paziente parkinsoniano presenta una postura definita camptocormica, caratterizzata da anteroflessione del collo, delle spalle e del tronco, ridotta velocità di movimento, ridotta ampiezza, dunque minore lunghezza del passo, riduzione delle sincinesie e difficoltà nel cambio di direzione; in fase avanzata di malattia, inoltre, possono subentrare anche fenomeni di start hesitation, freezing ed instabilità posturale che complicano ulteriormente l'andatura incerta del paziente.

Tipicamente i sintomi motori, in particolare la bradicinesia e la ridotta ampiezza del movimento, rispondono alla terapia sostitutiva con levodopa; tuttavia, dal punto di vista del cammino, bisogna considerare che l'introduzione di tale trattamento comporta il rischio di insorgenza di fluttuazioni on-off e discinesie che vanno a loro volta ad impattare sulla camminata del paziente.

### 2.1.3.3 Sintomatologia non motoria

I sintomi non motori<sup>3</sup>, invece, che vengono più spesso riferiti dal malato o dai familiari e che arrecano importanti disagi e limitazioni, peggiorando nettamente la qualità di vita, sono iposmia, ipofonia, disfagia e disartria, disturbi disautonomici,

approfonditi successivamente nella trattazione, disturbi del sonno, tra cui RBD, in cui i pazienti perdono la fase di paralisi tipica del sonno REM e lamentano sogni vividi, insonnia, sonnolenza diurna e sindrome delle gambe senza riposo, alterazioni neuropsichiatriche, alterazioni sensoriali come dolore e frozen shoulder<sup>12</sup>, e infine demenza e declino cognitivo, spesso a carico dei domini dell'attenzione, delle funzioni esecutive e visuospatiali e della memoria episodica, con comune risparmio del linguaggio eccetto che nel campo della disnomia<sup>13</sup>.

Tra le principali problematiche neuropsichiatriche si citano manifestazioni di carattere ansioso-depressivo, apatia, allucinazioni e psicosi.

In particolare, per quanto riguarda il declino cognitivo, la sintomatologia può essere suddivisa in fasi di progressiva severità, ovvero il declino cognitivo lieve (*mild cognitive impairment, MCI*) e la successiva demenza conclamata.

La demenza nella malattia di Parkinson si può riscontrare nell'80% dei casi, con un'incidenza doppia rispetto alla popolazione anziana sana, mentre l'MCI è riportato in circa 20-30% dei pazienti e rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo futuro di demenza.<sup>14</sup>

La demenza nella malattia di Parkinson assume dei connotati tipicamente disesecutivi con alterazioni principalmente a carico della componente sottocorticale-frontale, implicata nell'encoding e nel recupero delle informazioni mnesiche.<sup>15</sup>

Secondo la Movement Disorder Society Task Force l'analisi della demenza può essere approfondita a due livelli di accuratezza maggiore<sup>15</sup>.

In accordo con la valutazione di primo livello, la demenza viene diagnosticata come probabile in un paziente con malattia di Parkinson quando la sintomatologia cognitiva si manifesta successivamente a quella motoria in presenza di un declino cognitivo globale documentato da un punteggio <26 al MMSE di tale entità da ostacolare le attività quotidiane ed in caso di deficit specifici a carico di almeno due dei quattro domini principali (abilità esecutive, visuospatiali, memoria ed attenzione)<sup>15</sup>. L'attenzione viene testata con il test "Serial 7's" o "months reversed", la funzione esecutiva con la valutazione della fluenza verbale o con il "Clock Drawing Test", l'abilità visuospatiali con il disegno dei pentagoni ed infine la memoria con il "3-Word Recall".

Successivamente, la demenza viene approfondita con i test di secondo livello volti ad indagare l'efficienza cognitiva globale (Mattis Dementia Rating Scale), l'attività subcortico-frontale (funzioni esecutive quali memoria di lavoro ed a breve termine, abilità di concettualizzazione, attivazione e mantenimento di pattern e controllo comportamentale, apatia, memoria a lungo termine e capacità di recupero delle memorie), le funzioni strumentali (linguaggio e funzioni visuo-percettive) e le caratteristiche neuropsichiatriche.

## 2.1.4 DIAGNOSI

### 2.1.4.1 Anamnesi ed esame obiettivo

La presenza di alcuni dei sintomi motori precedentemente citati è imprescindibile per la diagnosi<sup>3</sup> di questa patologia, essendo quest'ultima un procedimento sostanzialmente clinico e solo supportato da evidenze radiologiche. Generalmente la diagnosi viene raggiunta in seguito alla raccolta anamnestica, in cui si ricercano possibili manifestazioni prodromiche e si indaga sull'eventuale familiarità positiva per malattia di Parkinson o altri disturbi del movimento, e l'esame obiettivo. Secondo i criteri diagnostici per la malattia di Parkinson redatti dalla Movement Disorder Society, condizione necessaria per diagnosticare questa patologia è la presenza di parkinsonismo motorio, dunque bradicinesia e almeno uno tra rigidità e tremore, caratteristica comunemente ritenuta patognomonica della malattia ma assente invece in circa 20% dei pazienti; ulteriori segni e sintomi aggiuntivi indicativi di malattia possono essere ipofonia, micrografia, riduzione delle sincinesie e dell'ampiezza dei passi, disturbi della marcia e atteggiamento ansioso-depressivo.

Al momento della diagnosi la componente che viene principalmente tenuta in considerazione è quella motoria, nonostante la consapevolezza scientifica dell'importanza della sintomatologia non motoria, la quale viene analizzata soprattutto nella fase prodromica.<sup>10</sup>

Una diagnosi su base clinica può essere stabilita con certezza in assenza di criteri di esclusione e di red flags e in presenza di almeno due di questi quattro criteri positivi<sup>10</sup>: tremore a riposo di un arto, una marcata risposta alla terapia dopaminergica, intesa come marcate fluttuazioni on/off o come un grande

miglioramento con l'aumento della dose o un peggioramento successivo al decremento di questa o come un miglioramento maggiore del 30% all'UPDRS III in seguito ai cambiamenti terapeutici, riscontro di discinesie indotte dall'assunzione di levodopa ed evidenza di due variabili con una specificità maggiore dell'80%, ovvero iposmia o denervazione simpatica cardiaca alla scintigrafia miocardica con iodio-123-meta-iodobenzilguanidina. Tra i criteri di esclusione<sup>10</sup> si citano anomalie cerebellari, movimenti oculari verticali alterati, demenza fronto-temporale o afasia primaria, atteggiamento parkinsoniano limitato agli arti inferiori per più di 3 anni, parkinsonismo iatrogeno, assenza di risposta alla levodopa, anomalie corticali, imaging del sistema dopaminergico negativo e una diagnosi differenziale valida. Le red flags<sup>10</sup>, invece, sono caratteristiche che dovrebbero portare il medico a prendere in considerazione diagnosi alternative e sono: progressione rapida e necessità di sedia a rotelle dopo 5 anni di malattia, stabilità clinica non connessa alla terapia per almeno 5 anni, disfunzione bulbare precoce, disfunzione inspiratoria, disautonomia severa esordita entro 5 anni, cadute ricorrenti entro i primi 3 anni, presenza di atteggiamenti distonici nei primi 10 anni, assenza di sintomi non motori dopo almeno 5 anni, tratti piramidali e parkinsonismo bilaterale.

#### 2.1.4.2 Tecniche di imaging

Le tecniche radiologiche e nucleari non sono necessarie per porre la diagnosi, ma vengono sfruttate per confermare la presenza di parkinsonismo qualora questo sia incerto all'esame fisico del paziente o per escludere altre patologie che entrano in diagnosi differenziale con questa condizione. A tal proposito l'esame più utile è il DaT Scan (*Dopamine Transporter Scan*), ovvero la quantificazione dei livelli cerebrali di trasportatore della dopamina in base alla rilevazione mediante SPECT (*single photon emission computed tomography*) del segnale prodotto dal legame tra i suddetti trasportatori e Iodio123 marcato (Iofuplane). Questo esame, dotato di sensibilità e specificità pari al 98-100%, mostra un'ipocaptazione dei putamina, in fase iniziale unilateralmente e a seguire bilateralmente, in caso di parkinsonismo, permettendo un'efficace diagnosi differenziale con il tremore essenziale in cui l'uptake risulta invariato.

La risonanza magnetica, invece, facilita la differenziazione della malattia di Parkinson dal parkinsonismo vascolare e dai parkinsonismi atipici, ovvero la

paralisi sopranucleare progressiva (PSP), caratterizzata dal “humming-bird sign”<sup>11</sup>, indice di atrofia mesencefalica, e l’atrofia sistemica multipla (MSA), in cui si riscontra il cosiddetto “hot cross bun sign”<sup>11</sup>, un’iperintensità pontina da atrofia.

In aggiunta, è opportuno considerare l’esecuzione di un test genetico in presenza di insorgenza precoce o familiarità positiva.

#### 2.1.4.3 Diagnosi differenziale

L’associazione di indagine clinica e metodiche di imaging è fondamentale per eseguire una fine diagnostica differenziale con le principali patologie affini<sup>11</sup>. Tra queste, l’atrofia multisistemica (MSA) è una sinucleinopatia neurodegenerativa caratterizzata dalla coesistenza in livelli più o meno equilibrati di parkinsonismo atipico o atassia cerebellare e disautonomia e viene suddivisa in due forme a seconda della sintomatologia predominante: MSA-P (maggiore rilievo di parkinsonismo), più diffusa in Europa ed America, e MSA-C (prevalente coinvolgimento cerebellare), più comune in Asia. La malattia si presenta con rapida progressione clinica, tremore generalmente posturale e cinetico, bradicinesia poco responsiva alla levodopa, instabilità posturale precoce, disautonomia prematura, disfunzione bulbare con disfonia, disartria e disfagia, disfunzione respiratoria ed incontinenza emotiva.<sup>11</sup>

La Paralisi Sopranucleare Progressiva (PSP) è una taupatia caratterizzata dal riscontro di bradicinesia ad esordio bilaterale rapidamente progressiva e rigidità prevalentemente assiali, instabilità posturale con incrementato rischio di cadute, facies tipica con riduzione dell’ammiccamento e abolizione dei movimenti saccadici verticali (oftalmoplegia verticale) e severo declino cognitivo (disfunzione esecutiva frontale<sup>12</sup>).

La Degenerazione corticobasale, invece, è un’ulteriore taupatia caratterizzata da parkinsonismo non responsivo alla levodopa inizialmente monolaterale, precoce instabilità posturale, distonia segmentale, segni corticali quali aprassia cinetica e ideomotoria, afasia, mioclono, fenomeno dell’arto fantasma e atrofia corticale fronto-parietale alla risonanza magnetica.

La Demenza a corpi di Lewy è una  $\alpha$ -sinucleinopatia caratterizzata dallo sviluppo di demenza precedente la comparsa di parkinsonismo o insorgente entro un anno

dal riscontro di quest'ultimo e associata a fluttuazioni cognitive e allucinazioni visive ricorrenti, disturbi del sonno, disautonomia e fenotipo acinetico rigido.

Il parkinsonismo vascolare, infine, presenta una patogenesi su base cerebrovascolare con un esordio improvviso principalmente a carico degli arti inferiori (*lower-body parkinsonism*) a livello dei quali si riscontrano una combinazione di rigidità e spasticità.

## 2.1.5 TRATTAMENTO

### 2.1.5.1 Terapia della componente motoria

La sintomatologia motoria è di fondamentale importanza non solo ai fini diagnostici ma anche perché in grado di rispondere alla terapia<sup>3</sup> dopaminergica. Il farmaco più utilizzato è la levodopa ad assunzione orale associata a un inibitore della DOPA decarbossilasi, somministrata a dosi ed intervalli orari differenti a seconda delle necessità del paziente, in modo da garantire la miglior copertura possibile. La somministrazione di dosi elevate in casi di patologia avanzata è accompagnata dal rischio di sviluppare discinesie motorie che nel 60% dei casi si rivelano invalidanti e spingono i pazienti a richiedere una modifica della terapia. Per evitare questo tipo di disturbi e la problematica opposta, ovvero la disabilità funzionale legata alle fasi off tra una dose e l'altra, spesso si tendono ad associare alla levodopa uno o più farmaci di diverse categorie: tra questi i dopamino agonisti (pramipexolo e ropirinolo per os, rotigotina transdermica e apomorfina sottocutanea), gli inibitori delle monoaminoossidasi B (selegilina, rasagilina, safinamide e zonisamide) e gli inibitori delle Catecol-O-metiltransferasi (Entacapone, Opicapone e Tolcapone) che inibiscono il metabolismo della levodopa e della dopamina. Mentre la prima tipologia di farmaci agisce direttamente in maniera positiva sulle vie di segnale dopaminergiche, le ultime due vanno a inibire gli enzimi che degradano la dopamina, potenziando l'effetto della levodopa. Esclusivamente per il tremore, invece, si possono utilizzare anche farmaci anticolinergici.

È fondamentale modulare la terapia sulla base dei benefici e dei rischi, in quanto alcune preparazioni possono causare effetti collaterali molto importanti, soprattutto nella popolazione anziana: i dopamino agonisti, per esempio, possono causare

frequentemente disturbi del controllo degli impulsi (ICD), tra i quali ludopatia, ipersessualità e alimentazione compulsiva.

Fondamentale nel trattamento dei sintomi motori della malattia di Parkinson è anche lo svolgimento di esercizio fisico e appropriata fisioterapia riabilitativa.

Esistono anche terapie avanzate che vengono proposte ai pazienti i cui sintomi motori rispondano alla terapia farmacologica ma che abbiano sviluppato complicanze motorie come periodi off e discinesie invalidanti non responsivi agli aggiustamenti terapeutici o a quei pazienti affetti da tremore refrattario al trattamento farmacologico. Le strategie in questione sono la stimolazione cerebrale profonda (DBS deep brain stimulation) e l'infusione duodenale di Duodopa (levodopa-carbidopa): la prima consiste nell'introduzione per via neurochirurgica di stimolatori posti a livello del nucleo subtalamico o del globo pallido interno e volti a regolamentare l'attività di queste strutture sulla base di parametri stabiliti dalla clinica, la seconda nella somministrazione costante e regolare del farmaco in formulazione appropriata attraverso una pompa che veicola il farmaco tramite una digiunostomia prossimale percutanea eseguita per via endoscopica transgastrica.

In caso di fenotipo tremorigeno è stato proposto l'utilizzo anche di DBS a livello del nucleo talamico intermedio ventrale, di ultrasuoni guidati o di talamotomia.

#### 2.1.5.2 Terapia della componente non motoria

Il trattamento della sintomatologia non motoria si basa su farmaci principalmente non dopaminergici e terapia non farmacologica comprendente fisioterapia e terapia occupazionale. Per la demenza il farmaco più accreditato è la rivastigmina, seguita da donepezil e galantamina per i quali non sussistono tuttavia sufficienti evidenze. Per la depressione le strategie più utili sono gli SSRI (*Selective serotonin reuptake inhibitors*), gli SNRI (*selective serotonin norepinephrine reuptake inhibitors*) e i TCA (*tricyclic antidepressants*), associati a terapia comportamentale (*cognitive behavioural therapy*), mentre per il trattamento della psicosi si ricorre generalmente a pimavanserina, agonista inverso del recettore serotoninergico 5-HT<sub>2A</sub>, clozapina e quetiapina.

I disturbi del sonno REM, per concludere, sono curati con melatonina ed eventualmente clonazepam.



## 2.2 DISAUTONOMIA NELLA MALATTIA DI PARKINSON

All'interno dei numerosi sintomi non motori della malattia di Parkinson, un importante ruolo è svolto dalle manifestazioni disautonomiche, tipicamente riscontrate a livello cardiovascolare, gastrointestinale, urinario, sessuale e, anche se in misura minore, termoregolatore. Queste anomalie aumentano progressivamente con l'evoluzione della patologia causando importanti effetti sulla qualità della vita e per questo motivo, considerata anche la presenza di alternative terapeutiche, è importante ricercare questa tipologia di problematiche nei pazienti.<sup>16</sup>

La disregolazione del sistema nervoso autonomo colpisce tutte le sue componenti (simpatico/parasimpatico, periferico/centrale) e si riscontra sia negli stadi precoci di malattia, sia in quelli avanzati; da alcuni studi, inoltre, sembra trasparire un legame tra una precoce comparsa di disautonomia e una più rapida progressione di malattia.

### 2.2.1 APPARATO CARDIOCIRCOLATORIO

Dal punto di vista cardiovascolare, la disautonomia è causata da una combinazione di alterazioni a carico della funzionalità dei barocettori e di denervazione simpatica e si manifesta in varie forme: ipotensione ortostatica, ipertensione supina e ipotensione postprandiale.

#### 2.2.1.1 Ipotensione ortostatica

L'ipotensione ortostatica<sup>17</sup> è definita come un calo della pressione arteriosa sistolica (PAS)  $\geq 20$  mmHg o della pressione arteriosa diastolica (PAD)  $\geq 10$  mmHg nei 3 minuti successivi al passaggio da clino a ortostatismo, determinato dall'assunzione della posizione eretta o dall'inclinazione a 60° al tilt table testing.

Se il decremento pressorio non avviene nei primi tre minuti ma successivamente, si parla di ipotensione ortostatica tardiva, una situazione che potrebbe favorire lo sviluppo della forma classica.

Ciò che caratterizza l'ipotensione ortostatica su base neurogena, ovvero la forma cronica che si riscontra nei pazienti con Parkinson, determinata dal deficit funzionale dei barocettori e dall'alterato rilascio di noradrenalina da parte dei nervi

simpatici efferenti postgangliari, è la stabilità della frequenza cardiaca che risulta normale o solo lievemente aumentata, a differenza delle forme non neurogene. In particolare, se la frequenza aumenta di un valore minore di 0,5 bpm per ogni mmHg perso, si può diagnosticare una forma neurogena di ipotensione ortostatica con una sensibilità del 97% e una specificità del 98%. Inoltre, a differenza della forma vasovagale, non si assiste alla comparsa di altri segni di attivazione autonoma come per esempio la sudorazione.

Fisiologicamente, quando una persona passa dalla posizione supina a quella eretta, i barocettori percepiscono il movimento e innescano il rilascio della noradrenalina volto ad indurre vasocostrizione e sostenere la pressione sanguigna. Nel paziente con Parkinson, invece, l'accumulo di depositi di  $\alpha$ -sinucleina nelle fibre nervose simpatiche postgangliari che innervano il miocardio e i vasi sanguigni determina un ridotto rilascio di noradrenalina e una ridotta vasocostrizione.

Questa alterazione pressoria sembra essere presente nel 30-50% dei malati di Parkinson, ma solo un terzo degli affetti presenta una sintomatologia correlata; esiste inoltre un altro 30% di pazienti che manifesta una sorta di intolleranza ortostatica sintomatica pur in assenza di rilievi pressori patologici.

I sintomi connessi a questa condizione sono senso di vertigine, sincope con eventuali cadute associate, disturbi visivi, dolore lombare e a livello di testa, collo e spalle, dispnea (dovuta al mismatch ventilo-perfusorio nel polmone apicale) e astenia. Generalmente si è visto che la sintomatologia compare quando la pressione media in ortostatismo è inferiore a 75 mmHg, inteso questo come il limite inferiore di autoregolazione cerebrale nei pazienti parkinsoniani.

La terapia si basa sulla sospensione di farmaci ipotensivi (quali diuretici, vasodilatatori ecc.), l'adozione di misure comportamentali come l'incremento dell'introito idrico e salino e l'utilizzo di sistemi per ridurre la stasi venosa, e la terapia farmacologica qualora le precedenti strategie non fossero sufficienti.

Quest'ultima si basa sull'uso di fludrocortisone, agonista mineralcorticoide sintetico volto ad aumentare il riassorbimento renale di sodio e acqua espandere il volume intravascolare e non appropriato nei pazienti con pregresso scompenso cardiaco, midodrina, agonista dei recettori  $\alpha$ 1 che determina vasocostrizione, drossidopa, profarmaco della noradrenalina approvato dalla statunitense Food & Drug Administration ma non in Europa, e piridostigmina, inibitore delle

acetilcolinesterasi che potenzia l'attività autonoma sia simpatica che parasimpatica.

Un importante effetto collaterale di questi farmaci è l'ipertensione supina, che può essere tuttavia anche un sintomo disautonomico vero e proprio.

#### 2.2.1.2 Ipertensione supina

L'ipertensione supina si presenta a prescindere dall'utilizzo della terapia appena citata nel 34-46% dei malati di Parkinson ed è definita come il riscontro di una PAS  $\geq 140$  mmHg e/o una PAD  $\geq 90$  mmHg dopo almeno 5 minuti di riposo in posizione supina, a differenza di quanto avviene nelle persone sane che sperimentano un fisiologico calo pressorio notturno del 10-20%.

L'aumento di pressione durante la notte è seguito da un aumento della natriuresi e da un'aumentata deplezione volumica che va a peggiorare la patologia ipotensiva durante la giornata.

Dunque, poiché spesso coesiste con l'ipotensione ortostatica diurna, nella valutazione del trattamento è necessario soppesarne i rischi ed i benefici: qualora l'ipertensione dovesse diventare severa (PAS  $\geq 160-180$  mmHg) e dunque a rischio di determinare danni d'organo, si introducono misure non farmacologiche o, se non sufficienti, ACE-inibitori, sartani,  $\alpha_2$  agonisti o vasodilatatori.

#### 2.2.1.3 Ipotensione postprandiale

Infine, soprattutto nei parkinsoniani più anziani, può comparire l'ipotensione postprandiale, tra i 15 minuti e le 3 ore successive ad un abbondante pasto ricco di carboidrati, o indotta dall'esercizio fisico.

### 2.2.2 APPARATO DIGERENTE

Per quanto riguarda il tratto gastrointestinale<sup>16</sup>, invece, la disautonomia può manifestarsi a diversi livelli, ad avvalorare l'importante coinvolgimento del sistema nervoso enterico nella patogenesi del Parkinson.

#### 2.2.2.1 Scialorrea

Secondo recenti studi circa il 40% dei pazienti parkinsoniani, soprattutto in fase avanzata di malattia, lamenta scialorrea, legata non tanto ad una eccessiva produzione di saliva che, anzi, risulta ridotta, bensì alla ridotta deglutizione e alla scarsa tenuta delle labbra.

Nonostante ciò, la terapia consiste sostanzialmente nella riduzione della produzione di saliva, in primis con l'iniezione di tossina botulinica nella ghiandola parotide, o, in alternativa, con l'assunzione di farmaci anticolinergici che rischiano però di aggravare la condizione di questi pazienti.

#### 2.2.2.2 Disfagia

Molto frequentemente (circa nell'80% dei casi di Parkinson) viene obiettivata la disfagia che, tuttavia, è percepita solo da meno della metà delle persone. Si presenta soprattutto, ma non solo, in fase avanzata di malattia; causa malnutrizione, polmonite da aspirazione e ridotta compliance terapeutica. Il trattamento è tipicamente non farmacologico, in quanto l'utilità di farmaci antiparkinsoniani e della deep brain stimulation rimane ancora controversa.

#### 2.2.2.3 Gastroparesi

Spesso in questa patologia si manifesta anche una condizione di gastroparesi, ovvero di rallentato svuotamento gastrico, che determina una sintomatologia invalidante comprendente nausea, vomito, dolore addominale, senso di ripienezza postprandiale e sazietà precoce, ma soprattutto altera l'assorbimento della Levodopa a livello dell'intestino tenue, minando all'efficacia della terapia.

#### 2.2.2.4 Disfunzione intestinale

Un altro aspetto molto evidente è quello della disfunzione intestinale. Questa si manifesta raramente come dismotilità del piccolo intestino e associata SIBO (small intestinal bacterial overgrowth), che sembra affliggere il 25-55% dei pazienti e alterare anch'essa l'assorbimento della Levodopa a causa delle modificazioni

effettuate sul farmaco ad opera degli enzimi batterici; molto più frequentemente invece compaiono una riduzione nella frequenza dei movimenti peristaltici, determinante stipsi, e difficoltà defecatoria.

La stipsi, legata al rallentato transito del materiale fecale nel colon, è lamentata dal 20-77% dei pazienti con Parkinson, con una mediana di 40-50%, ed è ormai universalmente ritenuta uno dei più importanti prodromi dello sviluppo della patologia. Per trattare questa complicanza molto fastidiosa per il paziente, in aggiunta alla dieta ricca di fibre e alla corretta idratazione, gli studiosi stanno analizzando l'efficacia specifica nel Parkinson dei più comuni lassativi in commercio e di tecniche non prettamente farmacologiche come, per esempio, il promettente trapianto di microbioma fecale.

### 2.2.3 APPARATO URINARIO

Dal punto di vista urinario<sup>16</sup>, la disfunzione ha uno spettro elevato di manifestazioni ed è certamente molto frequente (alcuni studi riportano prevalenze pari a 27-86%), talvolta anche nelle fasi iniziali di malattia.

Più frequentemente, poiché a causa della degenerazione dei neuroni dopaminergici tipica del Parkinson si riduce l'azione inibitoria dei gangli della base sui centri pontini della minzione, compare l'iperattività del detrusore, presente nel 45-100% dei pazienti che possono essere asintomatici o lamentare pollachiuria, nicturia e urgenza minzionale.

Tuttavia, questo tipo di manifestazione può essere affiancato o sostituito da forme di ipoattività del detrusore (40%) con incompleto svuotamento vescicale ed esitazione urinaria, bradicinesia sfinteriale (11-42%) e alterato rilasciamento degli sfinteri e dei muscoli pelvici.

Il trattamento della disfunzione urinaria si fonda su metodiche comportamentali e farmacologiche, ma per il momento sono ancora carenti gli studi di validazione delle metodiche proposte specificatamente sulla malattia di Parkinson; in particolare il trattamento della componente di iperattività risulta più soddisfacente, mentre spesso i sintomi ostruttivi sono più difficili da trattare.

#### 2.2.4 APPARATO RIPRODUTTORE

Nonostante non siano presenti molti studi sistematici in merito all'argomento, una componente autonoma che risulta spesso alterata in caso di Parkinson è quella sessuale<sup>16</sup>, con prevalenze pari all'80% secondo uno studio, essendo questa fortemente legata all'influenza del SNA sulle componenti neurovascolari implicate. Secondo un'importante metanalisi sembra che questa problematica affligga soprattutto il sesso maschile, per il quale sono anche stati condotti studi sull'efficacia di alcune strategie terapeutiche. In particolare, nell'uomo compaiono problemi di disfunzione erettile ed eiaculazione precoce (79%), nella donna calo della libido.

#### 2.2.5 TERMOREGOLAZIONE

Infine, nel 30-70% dei pazienti si riscontra una disfunzione nella termoregolazione<sup>16</sup>, probabilmente legata alla presenza di corpi di Lewy nell'ipotalamo, di aggregati di  $\alpha$ -sinucleina nei nuclei intermedio-laterali del midollo e nei gangli simpatici. A questo sembra concorrere anche una neuropatia a piccole fibre che determina ridotta innervazione di vasi sanguigni, ghiandole sudoripare e muscoli erettori piliferi, per quanto essa possa essere dovuta anche ad altre concomitanti alterazioni neurologiche.

Questi sintomi possono anticipare anche di 10 anni lo sviluppo di quelli motori e sono legati sia all'intolleranza al caldo che all'intolleranza al freddo.

In particolare, la sensazione di freddo è localizzata a livello delle estremità inferiori, mentre quella di eccessivo caldo a livello delle estremità superiori e del tronco; spesso è lamentata iperidrosi generalizzata o, se asimmetrica, soprattutto dal lato maggiormente coinvolto dal punto di vista motorio, ma può essere presente anche ipoidrosi con conseguenze sulla reazione al caldo.

Infine, è importante considerare anche che l'iperidrosi nel paziente parkinsoniano può essere correlata, piuttosto che ad una condizione di disautonomia, a fasi di discinesia o wearing-off.

## 2.3 MALATTIA DI PARKINSON GENETICA

Mutazioni genetiche correlate alla malattia di Parkinson sono riscontrabili circa nel 10-20%<sup>18</sup> dei pazienti e interessano principalmente geni coinvolti nel sistema dell'ubiquitinazione e nell'attività sinaptica, mitocondriale e lisosomiale. Il riscontro di una mutazione può determinare una precoce insorgenza di malattia, peculiarità fenotipiche e un aumentato rischio di sviluppo della malattia nei familiari.

### 2.3.1 SNCA

SNCA è stato il primo ad essere scoperto nell'ambito della genetica della malattia di Parkinson<sup>18</sup>; esso è localizzato sul cromosoma 4q21-23 e codifica per la proteina  $\alpha$ -sinucleina: la presenza di una mutazione a carico di questo gene, puntiforme o di duplicazione, determina anomalie qualitative della proteina, portandola ad aggregarsi più facilmente, alterazioni quantitative, post-trascrizionali, di interazione o di trasporto, agevolando l'instaurarsi di una patologia precoce con trasmissione autosomica dominante.

L' $\alpha$ -sinucleina anomala, quando mutata, altera la distribuzione dei componenti del sistema SNARE ed interferisce con il rilascio del neurotrasmettitore; perturba inoltre l'assemblaggio del citoscheletro e l'attività mitocondriale delle cellule, causando la frammentazione e l'inibizione dei loro complessi.

La presenza, invece, di polimorfismi di questo gene è implicata nella patogenesi della forma sporadica.

La malattia legata a questa mutazione, definita PARK1, ha una progressione più rapida con fluttuazioni motorie precoci e maggior complicità psichiatriche soprattutto se causata da una duplicazione del gene<sup>19</sup>.

### 2.3.2 PINK, PRKN E FBXO7

Molto importante è anche l'attività mitocondriale, il cui funzionamento viene minato da mutazioni a carico dei geni PINK1 e PRKN, regolatori dell'equilibrio e del controllo dei mitocondri: il primo gene (cromosoma 1p35-37) codifica per una serin-treonina chinasi che, quando correttamente funzionante, "marca" i mitocondri

danneggiati e recluta Parkin, una E3 ubiquitin ligasi codificata dal gene PRKN, localizzato sul cromosoma 6q25-27, per permettere la degradazione di queste strutture anomale mediante il processo di mitofagia. L'azione combinata di queste due proteine ha però anche un fine complementare al precedente, ovvero la biogenesi di nuovi organelli normo-funzionanti.

Le mutazioni di tipo *loss of function* a carico di PRKN e di PINK1 sono rispettivamente la prima e la seconda causa di malattia di Parkinson a trasmissione autosomica recessiva e, in base agli studi svolti negli ultimi anni, si pensa agiscano riducendo la mitofagia e rallentando la produzione di nuovi mitocondri.

Quando sussiste una di queste due mutazioni si verificano alterazioni a carico della mitofagia, la degradazione dei mitocondri disfunzionali, e si instaura una patologia caratterizzata da trasmissione autosomica recessiva, esordio precoce e progressione lenta, presenza di disautonomia, freezing, fluttuazioni motorie, discinesie ma minor incidenza di deficit cognitivi<sup>19</sup>; soprattutto in caso di mutazione di PRKN, inoltre, coesiste anche distonia.

Un'altra proteina implicata nel sistema mitocondriale è FBXO7 (*F-box only protein-7*), codificata dall'omonimo gene, preposta al reclutamento di Parkin.

### 2.3.3 GENI SECONDARI

Altri geni che, se mutati, causano malattia di Parkinson sono DJ-1, LRRK2 e ATP13A2.

Nell'ordine, DJ-1, localizzato sul cromosoma 1p36 e codificante per la proteina omonima ad attività antiossidante, determina una forma autosomica recessiva ad esordio precoce e progressione lenta, spesso associata a blefarospasmo. Una mutazione a carico di questo gene fa sì che la proteina non possa più fungere da sensore dei livelli di stress ossidativo ed attivare dunque i propri meccanismi protettivi, determinando un danno per le cellule nervose.

LRRK2, invece, mappa sul cromosoma 12p11-q13 e codifica per una *multidomain protein* con attività chinasi e risulta mutato in meno dell'1% delle forme di Parkinson sporadico e nel 4% delle forme familiari<sup>18</sup>; anche questo gene, tuttavia, costituisce anche un fattore di rischio genetico per lo sviluppo della malattia sporadica. Studi hanno dimostrato che causa una patologia autosomica dominante ad esordio tardivo ed evoluzione lenta e migliore risposta alla terapia con DBS. Ciò



che più frequentemente si verifica in caso di mutazione è un incremento dell'attività chinasi di questa proteina localizzata a livello del reticolo endoplasmatico, del complesso del Golgi e dei lisosomi, e coinvolta in numerose pathways di segnalazione quali la traduzione proteica, il trafficking vescicolare e l'attività citoscheletrica.

ATP13A2, infine, si trova sul cromosoma 1p36 ed esprime una ATPasi lisosomiale, determinando, se mutato, un parkinsonismo atipico autosomico recessivo con segni piramidali, demenza, oftalmoparesi e atrofia del globo pallido<sup>19</sup> (sindrome di Kufor-Rakeb)<sup>20</sup>.

## 2.4 MUTAZIONI DI GBA<sup>21</sup>

### 2.4.1 EPIDEMIOLOGIA

Il gene GBA<sup>22</sup>, codificante per l'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi (glucosilceramidasi  $\beta$ ) e noto come causa, se mutato, della malattia di Gaucher, è ritenuto ad oggi il più importante fattore di rischio genetico per lo sviluppo della malattia di Parkinson.

Una sua alterazione, infatti, deteriora l'enzima citato, innescando una serie di processi intracellulari che contribuiscono alla patogenesi della malattia neurodegenerativa, con un particolare impatto sull'accumulo di  $\alpha$ -sinucleina, sia nei pazienti affetti da Gaucher che nei pazienti asintomatici: c'è dunque una proporzionalità inversa tra attività della glucocerebrosidasi e accumulo di  $\alpha$ -sinucleina.

La presenza di una mutazione in eterozigosi a livello di questo gene determina infatti un aumento del rischio di manifestare la malattia di Parkinson pari a 5 volte, mentre una mutazione in omozigosi o in eterozigosi composta, dunque causante la malattia di Gaucher, incrementa anche il rischio di Parkinson di 10-20 volte.

Nella popolazione generale l'1% delle persone sono portatori eterozigoti di una mutazione di GBA, con un picco (8%) nella popolazione degli Ebrei Ashkenaziti<sup>23</sup>. Inoltre, la mutazione viene riscontrata in circa il 5-25% dei pazienti con malattia di Parkinson idiopatica.<sup>24</sup>

Non tutte le persone portatrici di questa tipologia di mutazioni, tuttavia, sono affette dalla malattia di Parkinson, in quanto il gene è caratterizzato da una penetranza

incompleta, con valori a 80 anni pari a circa 10%-30% a seconda degli studi considerati<sup>25</sup>.

A livello generale, la percentuale di pazienti parkinsoniani portatori di una mutazione a carico di GBA1 è stimata intorno al 7-12%, con un picco di incidenza nella popolazione degli Ebrei Ashkenaziti. Tra i paesi di etnia non ashkenazita, tuttavia, è proprio l'Italia ad essere enumerata tra gli stati con la maggior incidenza di GBA-PD: uno studio<sup>26</sup> molto importante condotto da studiosi italiani, il cui contenuto verrà successivamente approfondito, ha riportato infatti una prevalenza di mutazione di GBA pari a 14,3%, motivo per cui gli studi in questo campo, seppur vivaci in tutto il mondo, si stanno qui intensificando.

Inoltre, è stata notata la riduzione dell'attività della glucocerebrosidasi anche in pazienti parkinsoniani senza mutazione del gene GBA, a suggerire un suo ruolo nella patogenesi della malattia a prescindere dalla mutazione.<sup>24</sup>

Una storia familiare positiva è riportata in solo 21,5%-31% dei pazienti parkinsoniani con mutazione di GBA, a dimostrazione del fatto che in più di due terzi dei casi la mutazione è sporadica.<sup>23</sup>

#### 2.4.2 RUOLO DEL GENE

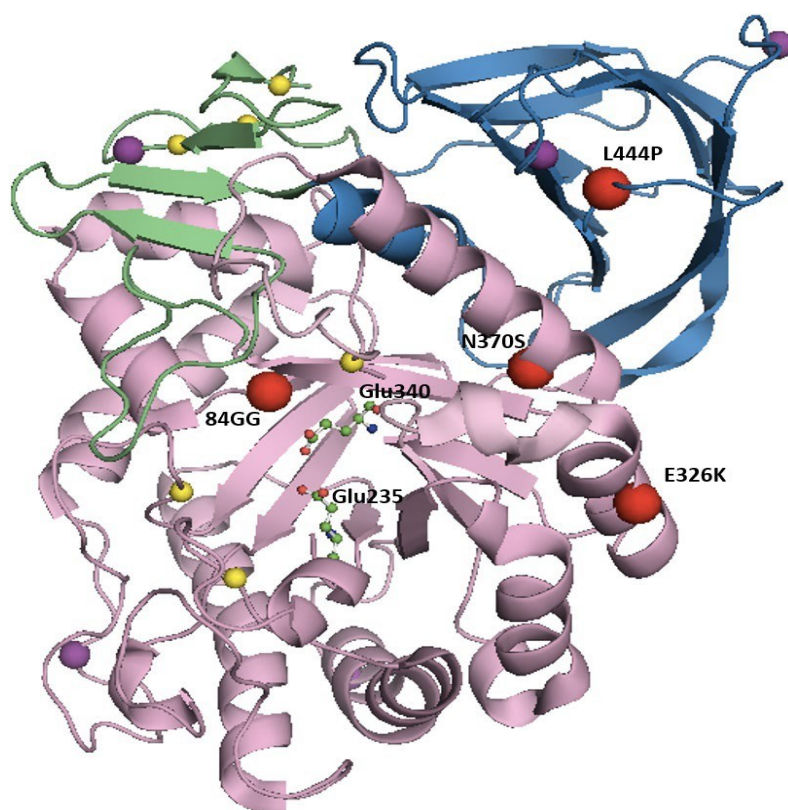
Il gene GBA1 è localizzato a livello del cromosoma 1q21, in un locus che contiene anche un suo pseudogene non tradotto, GBAP1, dotato del 98% di omologia, in merito al quale stanno tuttavia emergendo recentemente alcune teorie secondo cui esso avrebbe una funzione di modulazione dell'attività di GBA<sup>23</sup>. Esso comprende 11 esoni e 10 introni e contiene 700 paia di basi.

Codifica per l'enzima glucocerebrosidasi, una proteina di membrana di 497 amminoacidi di circa 62 kDa, che viene prodotta a livello del reticolo endoplasmatico, glicosilata e trasferita nel lisosoma ad opera del trasportatore LIMP2, codificato dal gene SCARB2. Questo enzima idrolizza le subunità di glucosio dal glucosilceramide e dalla glucosfingolisina, coadiuvato nella sua attività dalla proteina saposina C (SAPC).

GBA fa parte di un complesso di geni chiamato CLEAR (*coordinated lysosomal expression and regulation*), implicato nell'attività lisosomiale e trascritto dal fattore di trascrizione TFEB.<sup>20</sup>

La proteina (*Figura 2*) è formata da tre domini: il dominio I, costituito da una struttura a foglietto  $\beta$  antiparallelo e contenente due ponti disolfuro fondamentali per il mantenimento della struttura, il dominio II “immunoglobulin-like”, contenente due ulteriori foglietti  $\beta$ , e il dominio III contenente il sito catalitico, una triosofosfato isomerasi<sup>27</sup>.

*Figura 2: Struttura cristallina della glucocerebrosidasi a pH 5,5. In verde il dominio I, in blu il dominio II, in rosa il dominio III; in rosso alcune comuni mutazioni.*<sup>28</sup>



## 2.4.3 MALATTIA DI GAUCHER

### 2.4.3.1 Patogenesi

La principale patologia legata alle mutazioni di GBA1 è la malattia di Gaucher, una patologia sistemica da accumulo lisosomiale, a trasmissione autosomica recessiva, causata dall'accumulo a livello dei lisosomi dei macrofagi di glucosilceramide e glucosfingolisina, non metabolizzati dall'enzima deficitario. Questo determina lo sviluppo delle cellule di Gaucher, macrofagi anomali contenenti lisosomi alterati,

che si infiltrano a livello di diversi organi e causano la sintomatologia tipica della malattia. Le mutazioni a carico del gene possono essere puntiformi, frameshift, di splicing o dovute a ricombinazioni con lo pseudogene: ad oggi ne sono note più di 495, tra cui le più frequenti sono N370S (esone 9) e L444P (esone 10), e alcune di esse correlano anche con l'aumentato rischio di parkinsonismo.

Non sembra esistere, tuttavia, una correlazione tra sede della mutazione e fenotipo, a indicare l'esistenza di ulteriori fattori coinvolti.

#### 2.4.3.2 Tipologie

Storicamente, sono stati descritti tre tipi di malattia di Gaucher, sulla base del coinvolgimento o meno del SNC: non neuropatica (1), neuropatica acuta (2) e neuropatica cronica (3).

I pazienti con tipo 1 sono privi di interessamento neurologico e hanno una sintomatologia non neurologica variabile, caratterizzata da epatosplenomegalia, anemia, trombocitopenia, alterazioni ossee, fratture e osteopenia. La mutazione più frequentemente riscontrata e tipica è N370S.

La forma neuropatica acuta (tipo 2), caratterizzata da elevata mortalità, esordisce in epoca perinatale o neonatale precoce (generalmente entro i primi sei mesi di vita) e determina, oltre ai sintomi precedentemente citati, degenerazione neurologica, difetto di crescita, coinvolgimento del tronco encefalico (alterazione dei movimenti oculari, ipotonia, spasticità), disfagia e alterazioni delle vie aeree, con distress respiratorio e polmonite da aspirazione.

Il tipo 3, neuropatico subacuto, esordisce generalmente in epoca adolescenziale ed è caratterizzato dalla classica sintomatologia sistemica e dalla comparsa di alterazioni dei movimenti oculari con paralisi dapprima orizzontale e successivamente verticale e rallentamento delle saccadi, di mioclono, convulsioni generalizzate, encefalopatia e demenza progressive, atassia, aprassia, disturbi comportamentali e di apprendimento.

Questo sottotipo si può a sua volta suddividere in GD 3a, con interessamento viscerale e mioclono, 3b, con coinvolgimento principalmente, ma non solo, viscerale, e 3c, con associate calcificazioni della valvola mitralica e aortica.

I diversi sottotipi di GD sono caratterizzati da diverse mutazioni, più o meno frequenti e distribuite in maniera differente tra le varie etnie, che, poiché si tratta di una malattia autosomica recessiva, devono essere presenti in entrambi gli alleli.

Per quanto fare una correlazione genotipo-fenotipo non sia facile, si può dire che la mutazione N370S (c.1226A > G) è tipica della malattia di Gaucher di tipo 1, L444P (c.1448T > C) determina lo sviluppo di GD 2 e 3, mentre D409H (c.1342G > C) causa il sottotipo 3c.

#### 2.4.4 MALATTIA DI PARKINSON ASSOCIATA A MUTAZIONI DI GBA

La grande risonanza di questo gene è dovuta al suo legame con diverse e importanti patologie: la malattia di Gaucher, come visto, ma anche la malattia di Parkinson, la demenza a corpi di Lewy e i disturbi del sonno REM.<sup>29</sup>

##### 2.4.4.1 Patogenesi

Mentre il ruolo del gene di interesse nella malattia di Gaucher è ben definito, il suo coinvolgimento nella patogenesi della malattia di Parkinson, per quanto ormai certamente stabilito, rimane ancora in attesa di ulteriori approfondimenti scientifici. È dimostrato ad oggi che i livelli ematici di glucocerebrosidasi nei pazienti con malattia di Parkinson legata a mutazioni di GBA sono più bassi di quelli dei pazienti sani o con Parkinson idiopatico e che l'attività enzimatica residua è inversamente proporzionale alla severità clinica. In particolare, si è visto che i livelli di attività enzimatica si riducono significativamente in presenza di mutazioni severe, come verrà meglio approfondito in seguito, con una riduzione di circa 0.85 micromoli/h per ogni incremento di severità della mutazione<sup>30</sup>.

Studi anatomopatologici post-mortem condotti su materiale tissutale proveniente da pazienti con malattia di Parkinson da mutazione di GBA hanno dimostrato che in questi casi la glucocerebrosidasi viene riscontrata a livello dei corpi di Lewy, suggerendo che un suo anomalo funzionamento possa favorire la formazione di tali strutture<sup>18</sup>. Il pilastro principale di questa correlazione tra il gene e la patologia sembra dunque essere la capacità dell'attività deficitaria della glucocerebrosidasi di incrementare i depositi di  $\alpha$ -sinucleina, un elemento fondamentale nella patogenesi

del Parkinson. A sua volta, l'aggregazione di  $\alpha$ -sinucleina sembra in grado di compromettere l'attività della glucocerebrosidasi, determinando un circolo vizioso altamente dannoso.

A prescindere dall'effetto della mutazione -sia essa causa diretta di inattività della glucocerebrosidasi o determini alterazioni nel suo trasporto o, ancora, ne incrementi la degradazione proteasomiale- la ridotta attività enzimatica che inevitabilmente ne risulta porta ad un aumento degli aggregati non solo di glucosilceramide, glucosfingolisina e colesterolo glicosilato, ma anche di  $\alpha$ -sinucleina.

Quest'ultima è una proteina fisiologicamente presente nel corpo umano, probabilmente coinvolta nei processi di esocitosi, che, quando si accumula, può assemblarsi in maniera anomala andando a costituire aggregati e fibrille insolubili. È costituita da 140 amminoacidi riuniti a formare tre domini: una  $\alpha$ -elica aminoterminale legante i lipidi, un dominio legante l'amiloide e una coda acida carbossiterminale<sup>21</sup>.

Le principali ipotesi che sono state postulate per spiegare la proporzionalità inversa tra glucocerebrosidasi e  $\alpha$ -sinucleina sono (*Figura 3*)<sup>31</sup>:

1. Interazione diretta tra le due proteine: è stato dimostrato che, a livello lisosomiale, la glucocerebrosidasi interagisce con la porzione C-terminale dell' $\alpha$ -sinucleina, forse favorendone la degradazione ed inibendone l'eccessivo accumulo, motivo per cui una ridotta attività della proteina lisosomiale potrebbe portare al fallimento della proteostasi della seconda proteina. La glucocerebrosidasi infatti non sembra addetta a regolare il rapporto tra  $\alpha$ -sinucleina monomerica ed oligomerica, ma soprattutto ad eliminare gli aggregati.<sup>18</sup>

In caso di mutazione di GBA N370S associata al Parkinson, per esempio, la proteina mutata mostra una riduzione della sua affinità verso l' $\alpha$ -sinucleina.<sup>18</sup>

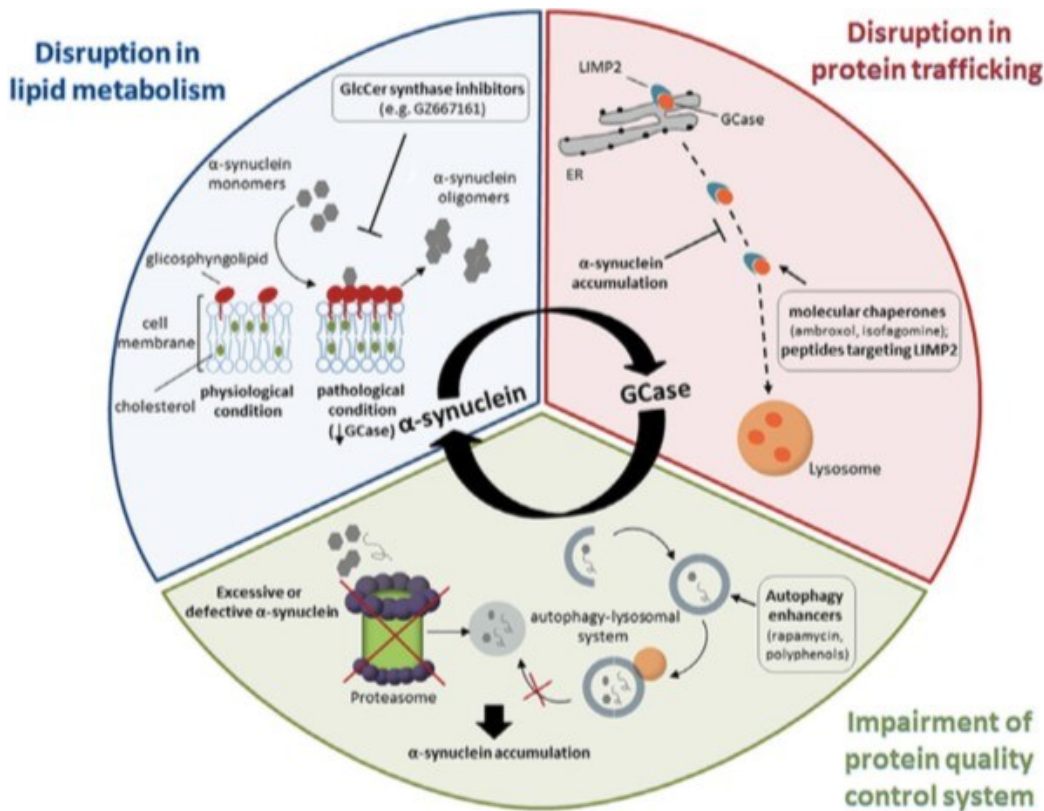
2. Stress del reticolo endoteliale: la mutazione del gene GBA1 determina l'accumulo della glucocerebrosidasi anomala all'interno del reticolo endoteliale, causando stress del RE nei neuroni dopaminergici, attivazione della risposta protettiva cellulare nota come Unfolded Protein Response e disattivazione delle pathway autofagiche, con danneggiamento delle cellule. Tutto ciò, unitamente al fatto che l'accumulo nel lisosoma dei prodotti non

degradati dalla glucocerebrosidasi altera direttamente i meccanismi di degradazione proteica, porta all'accumulo dell' $\alpha$ -sinucleina.

3. Disfunzione del trafficking lisosomiale: la ridotta attività enzimatica determina un aumento dei livelli di  $\alpha$ -sinucleina che, a sua volta, blocca il trasferimento della glucocerebrosidasi dal reticolo endoplasmatico al Golgi, sostanzialmente contribuendo ancora a ridurre i propri livelli.
4. Riduzione dell'attività autofagica e lisosomiale<sup>23</sup>: legata alla riduzione della funzionalità della glucocerebrosidasi, altera lo smaltimento dell' $\alpha$ -sinucleina.
5. Danno mitocondriale e stress ossidativo: da studi in vitro si è visto che la riduzione dell'attività della glucocerebrosidasi è legata ad un'importante disfunzione mitocondriale determinante stress ossidativo che a sua volta innesca l'aggregazione dell' $\alpha$ -sinucleina.
6. Alterazione del metabolismo lipidico<sup>23</sup>: l'inattività della glucocerebrosidasi porta ad un'alterazione del metabolismo degli sfingolipidi, normali costituenti della membrana lipidica. Poiché l' $\alpha$ -sinucleina fisiologicamente interagisce con gli elementi delle membrane, una loro alterazione influenza la conformazione della proteina e la sua aggregazione, oltre a determinare un danno lisosomiale.

Ciò che viene ipotizzato<sup>32</sup> alla luce di queste indagini prettamente molecolari è che la ridotta attività enzimatica della glucocerebrosidasi, piuttosto che determinare de novo l'avvio del processo patogenetico di accumulo inducendo la patologia, potrebbe più probabilmente accelerarne l'inizio o amplificarne l'evoluzione, aumentando la suscettibilità allo sviluppo della malattia. In particolare, questo processo può essere definito quantità-dipendente, in quanto la capacità della ridotta funzionalità della glucocerebrosidasi di aumentare la vulnerabilità dei pazienti e dunque il rischio di sviluppo di malattia è massima negli stadi precoci, quando i livelli di  $\alpha$ -sinucleina anomala sono minimi. Questo sarebbe in linea con il fatto che la mutazione di GBA aumenta di molto il rischio di sviluppare la malattia di Parkinson ma non causa una patologia monogenica ad alta penetranza, come accade invece per altri geni analizzati.

Figura 3: Cross-talk tra  $\alpha$ -sinucleina e glucocerebrosidasi nella patogenesi della malattia di Parkinson associata a mutazione di GBA<sup>23</sup>



#### 2.4.4.2 Mutazioni

Le mutazioni missenso di GBA più frequentemente riscontrate nei malati di Parkinson sono la N307S e la L444P; esistono inoltre alcune mutazioni specifiche in particolari etnie. Le due mutazioni citate sono localizzate nel sito di binding della Saposina C, attivatore della glucocerebrosidasi, nonché in quello della  $\alpha$ -sinucleina, sito in cui ne avviene l'inibizione. N307S, inoltre, impedisce alla glucocerebrosidasi di modificare appropriatamente la conformazione di una sua componente, il loop 3, quando esposta all'ambiente acido lisosomiale, alterandone la funzione. Un'altra mutazione, c.84dupG, invece, porta alla produzione di proteine di lunghezza sbagliata e non funzionanti, mentre c.1342G > C (D409H) e c.1297G > T (V394L) sono localizzate nel dominio I della proteina.



#### 2.4.4.3 Proposte terapeutiche

Alla luce di questa forte correlazione tra mutazione di GBA1, scarsa attività dell'enzima da esso codificato e parkinsonismo, sono stati attivati molti studi con lo scopo di ampliare lo spettro di terapie già esistenti<sup>24</sup> per i sintomi viscerali della malattia di Gaucher, quali SRT (*substrate reduction therapy*) e ERT (*enzyme replacement therapy*), rendendole utili anche per risolvere i sintomi neurologici o le forme di parkinsonismo (*Figura 4*). Il principio della ERT, terapia di prima linea per la malattia di Gaucher ma non efficace nella cura dei sintomi neurologici, consiste nell'utilizzo di glucocerebrosidasi umana con un residuo terminale di mannosio, non in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. Per questo motivo è in corso di studi una forma di glucocerebrosidasi ricombinante destinata a targettare i neuroni. Anche la SRT, terapia di seconda linea, non trova ancora spazio nella farmacopea della malattia di Parkinson, anche se alcuni farmaci inibitori della glucosilceramide sintetasi sono in corso di studi<sup>23</sup>.

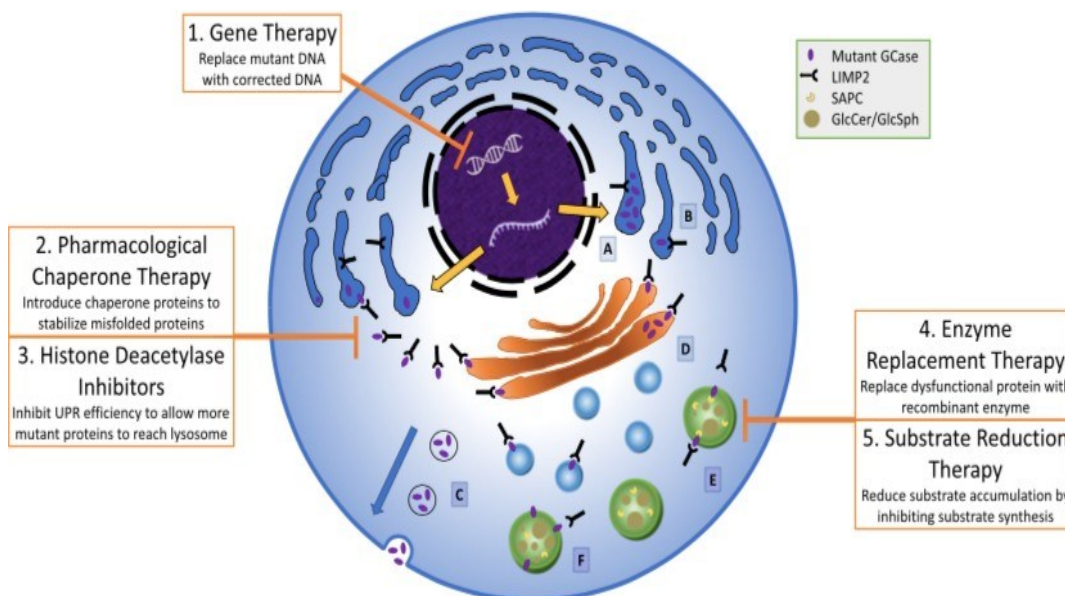
Tra le strategie ad oggi in corso di sviluppo si citano: la terapia genica, che consiste nel trasferire copie di GBA1 nelle cellule del sistema nervoso mediante l'ausilio di vettori adenovirali, con lo scopo di aumentare i livelli di glucocerebrosidasi e ridurre quelli di  $\alpha$ -sinucleina aggregata e la terapia con chaperoni, volti a ripristinare il corretto folding della glucocerebrosidasi.

Gli chaperoni hanno la funzione di incrementare il folding post-traduzionale e upregolare lo spostamento della glucocerebrosidasi mutata nei lisosomi e si dividono in inibitori e non inibitori: i primi si legano al sito attivo dell'enzima determinando dei cambiamenti conformazionali e impedendo il legame col substrato fino al momento della catalisi enzimatica lisosomiale, mentre i secondi legano un sito diverso determinando alcune modifiche<sup>23</sup>.

Tra gli chaperoni di maggior interesse si trovano l'Arimoclomolo e l'Ambroxolo che vanno, rispettivamente, a indurre l'attivazione delle Heat Shock Proteins, volte a ripristinare le proteine alterate, e a stabilizzare direttamente queste ultime.

Ambroxolo agisce come uno chaperone a comportamento misto nei confronti della glucocerebrosidasi, implementando la funzione lisosomiale e autofagica tramite l'attivazione del sistema CLEAR precedentemente citato, permettendo la riduzione dei livelli di  $\alpha$ -sinucleina.

Figura 4: Possibili meccanismi terapeutici per la malattia di Parkinson associata a mutazioni di GBA<sup>21</sup>



La comparsa di queste nuove proposte terapeutiche, più o meno avanzate nei processi di sperimentazione, è di notevole importanza in virtù dello spiccato ruolo della mutazione di GBA come fattore di rischio genetico della malattia e del suo coinvolgimento in un circolo vizioso con l' $\alpha$ -sinucleina che potrebbe rendere utili queste strategie nel trattamento di numerose forme di malattia.

#### 2.4.4.4 Clinica della M. di Parkinson associata a mutazioni di GBA

Sono stati condotti molti studi volti ad analizzare le differenze cliniche tra i portatori di mutazioni del gene GBA e i pazienti affetti da malattia di Parkinson idiopatica, da cui sono emerse molte peculiarità utili soprattutto dal punto di vista scientifico della ricerca piuttosto che del vero e proprio assessment durante la pratica clinica. Per quanto, infatti, la malattia associata a mutazione di GBA non sia al momento chiaramente distinguibile dalla forma idiopatica dal punto di vista clinico, è risaputo che la mutazione determina un aumentato rischio di sviluppare determinate caratteristiche.

I portatori di mutazione hanno generalmente un esordio di malattia più precoce rispetto ai non portatori, con un'età media all'esordio di 50-55 anni ed un'ulteriore anticipazione di 6-11 anni nei casi di omozigosi rispetto a quelli di eterozigosi.<sup>23</sup>

Il decorso risulta più aggressivo e la mortalità è doppia a causa dei livelli incrementati di demenza, disfagia, disautonomia e disabilità motoria.

Sostanzialmente, ciò che diversi studi hanno riportato in merito alle differenze tra malattia di Parkinson in pazienti portatori o meno di mutazione del gene GBA consiste in una più rapida evoluzione dei sintomi motori e in una più probabile comparsa di sintomi non motori quali problematiche disautonomiche, disturbi cognitivi, alterazioni del sonno REM e iposmia. Inoltre, si è evidenziato una sorte di effetto “dose” in base al quale i pazienti omozigoti o eterozigoti composti o affetti da mutazioni più severe accusano sintomi più invalidanti e precoci.<sup>29</sup>

I pazienti con mutazione<sup>24</sup> tendono ad esordire con bradicinesia in età precoce e ad avere un'evoluzione motoria peggiore; anche in questi soggetti, inoltre, i sintomi non motori precedono quelli motori, tuttavia lo fanno in maniera più severa.

Importante è, per esempio, la disfunzione visiva, dovuta alla degenerazione neuronale dopaminergica retinica e all'accumulo di  $\alpha$ -sinucleina nel mesencefalo e nella corteccia occipitale e parietale.

Nei pazienti con mutazione si riscontrano più frequentemente anche gastroparesi, stipsi, cadute, disfunzione sessuale, urinaria e ortostatica. Inoltre, i deficit cognitivi, specialmente a livello della memoria di lavoro, delle funzioni esecutive e delle abilità visuospatiali, sembrano essere aumentati di circa 2.4-3 volte<sup>23</sup> e sembrano caratterizzati da un'insorgenza anticipata, probabilmente a causa del ridotto flusso sanguigno a livello della corteccia parietale e del precuneo riscontrabile in presenza di mutazione piuttosto che nei casi idiopatici. Ad essere aumentata risulta anche la sintomatologia psichiatrica (1,8 volte maggiore<sup>23</sup>) con aumento di psicosi, allucinazioni, delirium, depressione, ansia (2,2 volte)<sup>23</sup> e apatia.

Infine, questi soggetti progrediscono più rapidamente agli stadi avanzati della scala Hoehn & Yahr.

Fondamentale in questo ambito è stato un lavoro multicentrico italiano, svolto in virtù dell'elevata prevalenza della mutazione di GBA in Italia, che ha analizzato gli aspetti clinici più rilevanti, stilando un elenco delle principali differenze riscontrate e correlandole con le diverse tipologie di mutazioni.<sup>26</sup>

Dallo studio è emerso come i portatori eterozigoti di varianti in questo gene nella coorte italiana analizzata raggiungano livelli importanti, pari al 14,3%, dunque di

gran lunga superiori alla precedente prevalenza italiana che si attestava intorno al 2,8-4,5%.

Un'analisi molto significativa riportata in questo studio dimostra che i pazienti con Parkinson e mutazioni del gene GBA, rispetto al gruppo di controllo senza mutazioni, presentano delle importanti differenze: anamnesi familiare più spesso positiva, età di insorgenza più precoce, prevalente fenotipo rigido-acinetico all'esordio, più rapida progressione verso uno stadio avanzato di malattia, maggiori complicanze motorie e non motorie. Tra gli aspetti non motori analizzati e risultati incrementati e precoci si citano: disautonomia, declino cognitivo, ansia, comportamenti impulsivi-compulsivi, allucinazioni, illusioni, fluttuazioni non motorie.

Conferme sostanzialmente unanimi arrivano da altre verifiche secondo cui il paziente con mutazione di GBA presenta disturbi disautonomici più marcati, un declino cognitivo più severo, maggiori problematiche psichiatriche e disturbi del sonno REM<sup>33</sup>.

In merito al declino cognitivo, in particolare, si è visto che questo esordisce precocemente e interessando i domini della memoria, visuospatiale, dell'astrazione, dell'orientamento, della memoria di lavoro e delle abilità esecutive.<sup>20</sup>

#### 2.4.4.5 Impatto delle diverse mutazioni

Le mutazioni del gene GBA possono inoltre essere sostanzialmente suddivise in mutazioni mild (determinanti forme di Gaucher non neuropatiche), severe (determinanti forme di Gaucher neuropatiche), ad aumentato rischio di sviluppo di malattia di Parkinson (ma non causa di Gaucher), complesse, ovvero dovute a fusioni tra gene e pseudogene, e sconosciute<sup>26</sup>.

Nelle mutazioni mild (per esempio N370S) è presente un'attività residua di glucocerebrosidasi pari a 32-38%, mentre nelle mutazioni severe (L444P) pari al 13-24%<sup>23</sup>.

In relazione alla capacità della mutazione di determinare un rischio di sviluppo di malattia di Parkinson, uno studio condotto su pazienti Ebrei ashkenaziti ha dimostrato che l'OR per le mutazioni lievi è circa 2.2, mentre quello per le mutazioni severe è 10.3, con una differenza di 5-6 volte. Il riscontro del

polimorfismo E326K, invece, determina un rischio di sviluppo di malattia ancora inferiore (1,7)<sup>34</sup>.

Per le mutazioni più frequenti, ovvero N370S e L444P, si sa che il rischio di sviluppare la malattia di Parkinson è pari rispettivamente a 3-4 volte e 6-12 volte<sup>23</sup>. In presenza di mutazioni severe la malattia tende ad esordire 4-5 anni prima rispetto ai pazienti con mutazioni mild <sup>35</sup> (2-13 anni secondo altri studi<sup>23</sup>) e ad evolvere verso un declino cognitivo più aggressivo e una ridotta sopravvivenza<sup>30</sup>. Il rischio di sviluppare demenza in presenza di mutazioni severe è 5.6 volte più alto rispetto all'assenza di mutazione, mentre è 2.9 volte più alto in caso di mutazioni lievi.<sup>24</sup> In particolare, la mutazione E326K, non legata alla malattia di Gaucher, è considerata un fattore genetico predittivo di sviluppo di declino cognitivo.

I portatori di mutazioni lievi hanno di fatto un fenotipo più simile alla malattia di Parkinson idiopatica, mentre i portatori di mutazioni severe hanno caratteristiche più affini alla demenza a corpi di Lewy<sup>23</sup>.

Provando ad analizzare in maniera più specifica l'entità clinica delle diverse mutazioni<sup>20</sup>, si è notato che la mutazione L444P, estremamente frequente, determina l'insorgenza di una patologia con un decorso più aggressivo, mentre il polimorfismo E326K, non correlato alla malattia di Gaucher, è associato a un'evoluzione patologica dei sintomi motori più rapida, a maggior riscontro di instabilità posturale, disturbi della marcia e declino cognitivo, ma ad assenza di tremore e discinesie. Inoltre, le mutazioni associate alla forma neuropatica di malattia di Gaucher, tra cui si cita, per frequenza, L444P, sono associate ad una più rapida insorgenza di demenza rispetto alle mutazioni legate alle forme non neuropatiche, ad esempio N370S (nelle mutazioni L444P 5,6 volte più che nei pazienti con Parkinson idiopatico e 2,9 volte più che nei pazienti con mutazione N370S). Differenze non sono state invece riscontrate dal punto di vista delle allucinazioni tra mutazioni severe e lievi.

Nello studio italiano<sup>26</sup> precedentemente citato i pazienti portatori di varianti severe hanno dimostrato un'età d'esordio ancora più precoce, una progressione più severa, un rischio maggiore di sviluppo di allucinazioni e declino cognitivo e un'insorgenza anticipata di disturbi dell'equilibrio; similmente, i portatori di varianti complesse presentavano le stesse caratteristiche con associato un aumento di allucinazioni.

Le mutazioni mild, invece, portano a riduzione del rischio di allucinazioni, a minor rischio di sviluppo di comorbidità psichiatriche e ad un ritardo nell'insorgenza di instabilità posturale e declino cognitivo; quelle che causano un rischio aumentato unicamente di malattia di Parkinson, infine, determinano le manifestazioni della patologia a un'età più avanzata e con tremore come sintomo dominante.

Sembra inoltre che siano i pazienti con mutazioni severe e non quelli con mutazioni mild a presentare una componente disautonomica più marcata rispetto alla forma idiopatica<sup>23</sup>.

Dal punto di vista dell'imaging, invece, i portatori di mutazioni severe esprimono una maggiore riduzione dell'attività della corteccia parieto-occipitale e dei terminali dopaminergici rispetto ai pazienti con mutazioni lievi<sup>23</sup>.

Un'analisi è stata svolta in altri studi<sup>23</sup> in merito alle differenze tra mutazioni in omozigosi, determinanti dunque sia malattia di Gaucher sia malattia di Parkinson, e mutazioni in eterozigosi: nel primo caso la patologia insorge mediamente 6-11 anni prima rispetto alla popolazione eterozigote, con un corredo maggiore di allucinazioni e disturbi del sonno, nel secondo caso invece 3-6 anni prima rispetto ai non portatori. In entrambi i gruppi, ma senza differenze, si dimostra inoltre un aumento di sintomi motori, come disfagia, disartria e freezing del cammino, sintomi non motori, quali depressione e ansia, e sintomi disautonomici (ipotensione ortostatica, stipsi e disfunzioni genito-urinarie), questi ultimi ritenuti causa della leggermente ridotta sopravvivenza dei pazienti con GBA mutato.

Secondo un ulteriore studio<sup>33</sup>, invece, i pazienti con mutazione in omozigosi o in eterozigosi composta, oltre a presentare un esordio anticipato, lamentano anche sintomi motori più gravi con punteggi più alti all'MDS UPDRS III, stato cognitivo più invalidato con punteggi più bassi al MoCA, più frequenti disturbi del sonno ed allucinazioni, rispetto sia ai pazienti con Parkinson idiopatico sia a quelli con mutazione eterozigote di GBA. Non sono invece riscontrate differenze dal punto di vista della disautonomia in base all'omozigosi o eterozigosi della mutazione.

#### 2.4.4.6 Imaging della malattia di Parkinson associata a mutazioni di GBA<sup>36</sup>

I pazienti affetti da malattia di Parkinson associata a mutazione di GBA, come afferma uno studio di revisione sistematica della letteratura, presentano un quadro più aggressivo di malattia sia alla risonanza magnetica strutturale sia al DaT Scan; gli studi di perfusione cerebrale e la PET, inoltre, mostrano un maggior coinvolgimento corticale rispetto alla forma idiopatica, in accordo con il declino cognitivo maggiormente espresso da questi soggetti.

In particolare, è stato riscontrato alla risonanza magnetica avanzata un pattern di assottigliamento cerebrale dapprima prevalentemente sinistro e principalmente a carico della corteccia temporale, parietale e occipitale, successivamente invece anche a livello frontale e orbitofrontale. L'aspetto fondamentale è che queste alterazioni nei portatori di GBA mutato appaiono mediamente 5 anni prima rispetto ai pazienti con forma idiopatica, in parallelo, appunto, con le note peculiarità cliniche di disturbo cognitivo. Sono inoltre state evidenziate alterazioni a carico della sostanza grigia (tuttavia non confermate da tutti gli studi) e della sostanza bianca nonché danni più evidenti a livello del tratto olfattivo, del corpo calloso, della capsula interna ed esterna, del giro dei cingoli, del tratto paraippocampale sinistro e del fascicolo longitudinale superiore parietale sinistro.

La risonanza magnetica funzionale a riposo mostra che nei pazienti con mutazione ma non ancora presentanti la patologia di Parkinson esistono un'incrementata connessione tra il putamen posteriore sinistro e il giro postcentrale sinistro e tra il caudato sinistro e l'opercolo parietale destro e il planum temporale e ulteriori meccanismi di compenso che fanno sì che i pazienti nella fase preclinica non abbiano deficit cognitivi. I pazienti con espressione di malattia, invece, mostrano una ridotta connessione funzionale nella corteccia parieto-occipitale, similmente ai pazienti con demenza a corpi di Lewy o malattia di Parkinson con allucinazioni visive.

Inoltre, in questi casi la PET mostra una maggior espressione dei pattern di funzionalità tipici del Parkinson e del deficit cognitivo, mentre gli studi di perfusione cerebrale evidenziano nei pazienti con mutazione di GBA di tipo severo una riduzione di flusso sanguigno a livello occipitale e parietale posteriore, mentre in quelli con mutazione lieve una situazione paragonabile al Parkinson idiopatico. Dal punto di vista del DaT Scan, i diversi studi condotti non sono concordi

nell'affermare se esistano o meno alterazioni più marcate del sistema dopaminergico. Interessante, infine, è la differenza riscontrata tramite ecografia transcranica a carico del sistema serotoninergico, connesso ai maggiori livelli di sintomi neuropsichiatrici e disautonomici.

#### 2.4.5 DEMENZA A CORPI DI LEWY E RBD

Infine, per concludere la trattazione in merito a questo gene, è importante sottolineare che una sua mutazione è riscontrata molto frequentemente anche nelle persone affette da demenza a corpi di Lewy ed associata in maniera ancora più specifica a disordini comportamentali del sonno REM (REM sleep behaviour disorders, RBD).<sup>29</sup> Addirittura, il rischio di sviluppare demenza da corpi di Lewy in caso di positività alla mutazione è maggiore di tre volte rispetto a quello di sviluppare il Parkinson, con un'anticipazione sull'età d'esordio di circa cinque anni e una sintomatologia più severa. Tra le mutazioni più significative in questo senso si citano sempre N370S e L444P, più c.1093G > A (E326K) che è spesso riscontrata anche nei pazienti con Parkinson e demenza.

Le stesse tre mutazioni, in aggiunta a c.1223C > T (T369M), sono anche quelle più frequentemente riscontrate nei disturbi del sonno REM, ovvero dei disordini prodromici che nel 97% dei casi evolvono in malattia di Parkinson e altre sinucleinopatie (atrofia multisistemica, demenza a corpi di Lewy, Parkinson con demenza). Rispetto ai controlli senza mutazione, è aumentato il rischio di sviluppare RBD, soprattutto in caso di omozigosi, ma non sembra essere incrementato il rischio di fenocconversione in malattia di Parkinson.

Infine, alcuni studiosi hanno analizzato la prevalenza di mutazioni di GBA in casi di atrofia multisistemica, ottenendo tuttavia risultati contrastanti, probabilmente imputabili alla rarità della malattia.<sup>29</sup>



### **3) SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo del presente studio è quello di fornire una descrizione dettagliata di una coorte di pazienti affetti da malattia di Parkinson associata a mutazioni del gene GBA provenienti da un'area ristretta del Nord-Est Italia, che finora non è stata oggetto di studi genetici specifici per indagare la frequenza mutazionale di questo gene nella popolazione di pazienti con malattia di Parkinson residenti in questa particolare area. Ulteriore scopo dello studio è stato verificare se i pazienti portatori di mutazioni di GBA presentino delle peculiarità cliniche e di decorso di malattia rispetto ai non carriers che ne possano facilitare il riconoscimento. Tra queste, particolare importanza è stata data alla valutazione delle alterazioni disautonomiche che sono note in letteratura come una caratteristica prominente della malattia di Parkinson legata a mutazioni di GBA. Per tale scopo è stato utilizzato un questionario facilmente somministrabile ai soggetti anche telefonicamente (COMPASS-31).

Un ulteriore interesse di questo studio è quello di stabilire quali siano le mutazioni a carico del gene GBA più frequentemente rilevate per valutare se la distribuzione di tali varianti risulti in linea con quanto riportato in letteratura o se nella coorte di pazienti analizzata siano state riscontrate alcune mutazioni non precedentemente note.

Una precisa definizione di questa tipologia di malattia di Parkinson mira alla sua precoce individuazione e differenziazione, se possibile, dalle altre forme di questa patologia, essendo quest'ultima molto studiata, al momento, anche per le sue interessanti proposte terapeutiche in corso di sperimentazione. Uno studio su tali aspetti, seppur su piccola scala, potrebbe contribuire ad avvalorare la grande attenzione scientifica dedicata negli ultimi anni a questa tipologia di malattia di Parkinson e a fornire spunti per approfondimenti condotti con numerosità campionarie maggiormente significative.



## 4) MATERIALI E METODI

La coorte di pazienti inclusa in questo studio comprende 20 pazienti con diagnosi di malattia di Parkinson ed evidenza di una mutazione patogena del gene GBA che afferiscono, o hanno afferto, alla Clinica Neurologica dell'Azienda Ospedaliera di Padova ed alla Clinica Villa Margherita di Arcugnago (Vicenza).

### 4.1 ANALISI GENETICA

Ciascuno di questi soggetti ha ricevuto la diagnosi di malattia di Parkinson genetica da mutazione di GBA in seguito all'esecuzione di un test genetico, eseguito nella maggior parte dei casi presso l'Azienda Ospedaliera di Padova e comprendente un pannello di 80 geni correlati ai disturbi del movimento, di cui 14 specifici per la malattia di Parkinson, analizzato mediante tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) sfruttando le piattaforme Illumina NextSeq550 e Illumina MiSeq. La predizione di patogenicità delle mutazioni riscontrate è stata poi ricavata prendendo in considerazione la MAF (minor allele frequency) delle varianti nonché i principali programmi di analisi in silico (ExAc, 1000genomes, ClinVar, Varsome) e dalla consultazione di quanto reperibile in letteratura in merito a patogenicità, frequenza e correlazione clinica delle singole mutazioni.

#### 4.1.1 NEXT GENERATION SEQUENCING

La sigla NGS<sup>37</sup> indica l'insieme dei metodi di sequenziamento sviluppati successivamente al sequenziamento secondo Sanger che permettono di svolgere un'analisi massiva di milioni di frammenti di DNA e RNA in parallelo, garantendo massima efficacia nell'analisi di ingenti quantità di materiale genomico. Questi metodi accoppiano la fase di reazione enzimatica e di analisi dei dati e si suddividono in tecniche di sequenziamento per sintesi (*sequencing by synthesis*) e di sequenziamento per ibridazione (*sequencing by hybridization*).

Nel primo caso<sup>38</sup> le molecole di DNA vengono amplificate e sottoposte a reazioni di sintesi che coinvolgono nucleotidi marcati che rendono visibile mediante reazioni chimiche o fluorescenza la sequenza che viene ricreata. Più specificamente, il materiale da analizzare subisce una frammentazione in segmenti

alle cui estremità vengono successivamente legati degli adattatori specifici, ovvero sequenze oligonucleotidiche note, creando una libreria. La libreria viene poi disposta su una piastra contenente sequenze complementari agli adattatori che vanno ad ibridizzarsi ai frammenti, fungendo da primer per l'amplificazione mediante PCR del materiale da sequenziare. Lo step finale è proprio il sequenziamento che avviene mediante processi di sintesi ad opera di una DNA-polimerasi, durante i quali l'aggiunta di un nucleotide emette fluorescenza, venendo rilevato da appositi macchinari.

Nel secondo caso, invece, si uniscono ripetutamente campioni noti di oligonucleotidi a frammenti di DNA da analizzare, per giungere a determinare, osservando quali sequenza vadano effettivamente ad ibridarsi, quale sia la sequenza genica di interesse.

Successivamente i risultati del sequenziamento NGS vengono di solito confrontati con database basati su genomi di riferimento.

In particolare, la tecnologia Illumina, ad oggi la più utilizzata, sfrutta la tecnica di *bridge amplification* in cui frammenti di DNA della lunghezza di circa 500 paia di basi, legati a specifici adattatori, vengono amplificati in reazioni ripetute che utilizzano come primer sequenze oligonucleotidiche complementari agli adattatori. Questo sistema consente la contemporanea esecuzione di milioni di reazioni di amplificazione, riducendo enormemente le tempistiche di analisi e i costi di lavorazione. Durante la reazione, nucleotidi marcati vengono incorporati in maniera complementare e successivamente rilevati direttamente grazie alla fluorescenza; il processo viene ripetuto per più di 300 volte.

## 4.2 ANALISI CLINICA

I principali dati clinici raccolti retrospettivamente per singolo paziente hanno incluso: storia familiare, sintomatologia motoria e non motoria, evoluzione clinica ed efficacia della terapia nel controllo dei sintomi motori.

### 4.2.1 ANALISI DELLE CARATTERISTICHE MOTORIE

La valutazione motoria è stata effettuata utilizzando la scala MDS-UPDRS (in 17 pazienti)<sup>39</sup> e la stadiazione di Hoehn & Yahr<sup>40</sup> (15 pazienti).

Per quanto riguarda la scala MDS-UPDRS è stata valutata la parte III, specifica per l'aspetto motorio della malattia, essendo state le altre parti sostanzialmente esaurite con le domande specifiche poste ai pazienti durante la valutazione clinica.

## 4.2.2 ANALISI DELLE CARATTERISTICHE NON MOTORIE

### 4.2.2.1 Valutazione neuropsicologica

I pazienti sono stati sottoposti ai principali questionari per la determinazione del funzionamento cognitivo globale, ovvero MMSE (Mini- Mental State Examination) e MoCA (Montreal Cognitive Assessment). Il test MoCA è lo strumento di valutazione cognitiva più efficace nei pazienti con MCI (Mild Cognitive Impairment) ed Alzheimer (cut-off 25 punti) e si basa sull'analisi di sette categorie: abilità esecutive e visuospatiali, denominazione, memoria, attenzione, linguaggio, capacità di astrazione ed orientamento.

Quest'ultimo è risultato in numerosi studi lo strumento più sensibile ed adatto per valutare il declino cognitivo nel paziente con malattia di Parkinson: il cut-off che permette di eseguire una diagnosi è  $\leq 25$  punti<sup>13</sup>.

Per quanto riguarda invece il MMSE il cut-off più comunemente utilizzato è  $< 26$  punti, ma esso non è stato validato per la valutazione nella malattia di Parkinson.<sup>14</sup> Nello specifico, la letteratura<sup>14</sup> dimostra che il MoCA è più sensibile rispetto al MMSE, pur essendo quest'ultimo il test più utilizzato, nel determinare la presenza di MCI e demenza in pazienti non affetti da malattia di Parkinson, mentre non sono ancora presenti sufficienti studi per affermare una sua validità anche nell'ambito della malattia di Parkinson. Generalmente il test più utilizzato per effettuare un assessment cognitivo nella popolazione parkinsoniana è il MMSE, tuttavia non ci sono studi che ne accertino l'adeguatezza in questo ambito e, anzi, la sua performance appare inferiore rispetto a quella del test MoCA. Gli studi<sup>14</sup> condotti in merito a questo argomento affermano che lo strumento migliore da utilizzare in un contesto di malattia di Parkinson è il test MoCA, ma che un approfondimento con una batteria di test è necessario qualora la valutazione con entrambi i test risulti positiva per disturbi cognitivi.

#### 4.2.3 CONFRONTO IN BASE ALLA SEVERITA' DELLE MUTAZIONI

All'interno del gruppo dei casi con mutazione di GBA sono stati presi in considerazione alcuni parametri (età d'esordio, presenza ed entità dei sintomi cognitivi, sintomi psichiatrici, allucinazioni e punteggio alla scala disautonomica COMPASS 31) per eseguire un confronto, seppur molto limitato per l'incertezza del significato di alcune mutazioni e per l'esigua numerosità del campione, tra mutazioni severe e lievi di GBA. I test statistici utilizzati per il confronto sono stati il test esatto di Fisher per le variabili qualitative ed il test non parametrico di Mann Whitney per quelle quantitative.

#### 4.2.4 CONFRONTO PD-GBA CON PAZIENTI GENETICAMENTE NEGATIVI

Il passo successivo, volto ad ampliare la descrizione fenotipica della coorte di pazienti con mutazione di GBA verificando se questa determini la presenza di differenze cliniche, è stato quello di andare ad eseguire un confronto con una coorte di pazienti privi di questa caratteristica. Per rendere il confronto il più obiettivo possibile sono stati selezionati appositamente alcuni pazienti in cura nei medesimi centri, stabilendo dei filtri nel reclutamento che hanno portato alla creazione di un gruppo composto da 20 pazienti affetti da malattia di Parkinson.

I requisiti nella composizione del gruppo di controllo, nei limiti di quanto possibile considerata la numerosità campionaria ristretta, sono stati:

- Diagnosi di malattia di Parkinson effettuata secondo gli attuali criteri in vigore<sup>10</sup>;
- Esecuzione di test genetico per la ricerca delle principali mutazioni che determinano la malattia di Parkinson con risultato negativo, in modo da sincerarsi che non fosse eventualmente presente, nei limiti di quanto scientificamente noto, una mutazione differente da quella di GBA che potesse influenzare le analisi contribuendo ad allontanare la connotazione clinica dalla forma idiopatica;
- Età media del gruppo paragonabile a quella dei pazienti con mutazione;
- Età all'esordio confrontabile tra i due gruppi;
- Durata di malattia paragonabile tra i due gruppi;

- Equa distribuzione per sesso;
- Equa distribuzione dei trattamenti avanzati (PEG-J e DBS) tra i due gruppi.

L'omogeneità tra i due gruppi in relazione ad età media, durata di malattia ed età all'esordio è stata verificata statisticamente mediante l'utilizzo di un test non parametrico a due code, il Mann-Whitney U test, con livello di significatività pari a 0,05, scelto perché applicabile senza vincoli di numerosità campionaria e normalità della distribuzione.

Il confronto tra i due gruppi indipendenti per le variabili qualitative dicotomiche è stato effettuato con il test esatto di Fisher con significatività 0,05, in quanto più opportuno di quello del  $\chi^2$  in un contesto di campioni piccoli, mentre quello tra variabili quantitative mediante il Mann-Whitney U test con significatività 0,05.

#### 4.2.5 VALUTAZIONE DELLA DISAUTONOMIA: LA SCALA COMPASS 31

Un'attenzione particolare nell'ambito di questo confronto è stata dedicata all'aspetto disautonomico della patologia, estremamente comune nei pazienti con malattia di Parkinson e, soprattutto, molto invalidante.

Per effettuare un'analisi approfondita, il metodo di valutazione della componente disautonomica scelto per questo studio è stato il questionario "COMPASS 31", sviluppato da esperti della Mayo Clinic nel 2012<sup>41</sup> a partire da due precedenti scale valutative, "Autonomic Symptom Profile" e "COMPASS", con lo scopo di introdurre un sistema di indagine più semplice, pratico e statisticamente significativo rispetto alle opzioni precedentemente utilizzate. Questo questionario, somministrabile al paziente in modo rapido ed efficace, consta di 31 domande a scelta multipla, le cui diverse opzioni di risposta presentano punteggi di valore progressivamente maggiore proporzionalmente alla rilevanza ed all'impatto clinico del fattore considerato.

Le 31 domande, volte ad indagare la presenza o meno di alcuni sintomi disautonomici, la loro frequenza, gravità ed evoluzione, sono raggruppate in sei gruppi (*Figura 5*) che indagano rispettivamente l'intolleranza ortostatica (*orthostatic intolerance*), la componente vasomotoria (*vasomotor*), la componente

secretomotoria (*secretomotor*), l'apparato gastrointestinale (*gastrointestinal*), l'attività vescicale (*bladder*) e la funzionalità pupillomotoria (*pupillomotor*). Tra i sintomi indagati, in particolare, si trovano nell'ordine l'ipotensione ortostatica, le disfunzioni circolatorie, i cambiamenti nell'ambito della sudorazione, della lacrimazione e della salivazione, la gastroparesi, la diarrea, la stipsi, i disturbi urinari, la sensibilità alla luce e l'accomodazione.

Ciascuna risposta di ogni categoria è associata ad un punteggio, la cui somma permette di ottenere un valore unico indicante il coinvolgimento delle varie aree analizzate. Tuttavia, poiché ai fini della definizione di coinvolgimento disautonomico globale alcuni disturbi assumono una rilevanza maggiore dal punto di vista clinico, ad ogni sottogruppo è stato assegnato un coefficiente che permette di ponderare l'impatto dei diversi sintomi nella totalità del coinvolgimento disautonomico.

Il coefficiente maggiore (4) appartiene alla sezione "intolleranza ortostatica" ed è seguito dalla componente secretomotoria (2.1428571), vescicale (1.1111111), gastrointestinale (0.8928571), vasomotoria (0.83333333) e pupillomotoria (0.3333333).

Figura 5: Dettaglio della scala di valutazione della disautonomia COMPASS-3I<sup>41</sup>

Domain	No. of questions	Max raw score	Weighting factor	Max weighted score	Cronbach $\alpha$
Orthostatic intolerance	4	10	4.0	40	0.92
Vasomotor	3	6	0.83333333	5	0.91
Secretomotor	4	7	2.1428571	15	0.48
Gastrointestinal <sup>b</sup>	12	28	0.8928571	25	0.78
Bladder	3	9	1.1111111	10	0.62
Pupillomotor	5	15	0.33333333	5	0.84
Total	31	75		100	

<sup>a</sup> Appropriate weighting factors for each domain result in appropriately balanced autonomic domains and a total score between 0 and 100. Max = maximum.  
<sup>b</sup> Combines former constipation, diarrhea, and gastroparesis domains into one domain.

Ciò che si ottiene alla fine dunque è un punteggio che va da 0 a 100 e che si può correlare al grado di disautonomia del soggetto. Molto importanti sono però anche i punteggi puri delle varie aree perché esprimono un'idea maggiormente individuale della condizione dei vari pazienti.

In virtù della rilevanza della sintomatologia non motoria nei pazienti con malattia di Parkinson da mutazione di GBA, anche in questo frangente i risultati ottenuti in questa scala di valutazione della disautonomia dai pazienti con mutazione sono stati



poi confrontati con quelli del medesimo gruppo di controllo comprendente pazienti affetti da malattia di Parkinson standardizzato per età, sesso e durata media di malattia, per valutare se i sintomi disautonomici siano più o meno frequentemente sperimentati dai soggetti mutati. La scelta di pazienti parkinsoniani giovani, oltre ad aver permesso una standardizzazione efficace per quanto riguarda la patologia neurologica in sé, ha consentito anche di ridurre, almeno in parte, l'entità delle comorbidità che gravano sulla popolazione anziana e che inficiano le caratteristiche analizzate dal questionario sulla disautonomia, quali per esempio le patologie cardiache, circolatorie, gastrointestinali (diverticolosi, IBD, neoplasie), prostatiche o ginecologiche e oculistiche.

Il test è stato somministrato telefonicamente, via e-mail o di persona al momento della visita. Nel gruppo con mutazione sono state ottenute 16 risposte su 20 in quanto 3 pazienti sono andati incontro al decesso e uno è risultato non contattabile, nel gruppo con test genetico negativo le risposte sono state invece 18 su 20 in quanto non è stato possibile mettersi in contatto con tutti i pazienti e si è scelto di non considerare un soggetto in quanto affetto da malattia di Crohn che causava un importante bias nella determinazione della disautonomia nell'apparato gastrointestinale.

Per eseguire il confronto è stato inizialmente svolto il test di Shapiro-Wilk per verificare la normalità delle distribuzioni dei due campioni: poiché il gruppo dei pazienti con mutazione risultava normale, mentre il gruppo di quelli senza mutazione risultava non normale, si è scelto di utilizzare anche in questo caso il test non parametrico di Mann Whitney con livello di significatività di 0,05.

#### 4.2.6 CONFRONTO GBA-PD VS PARKINSON IDIOPATICO

Considerato che il precedente confronto è stato condotto tra pazienti con mutazione genetica, tipicamente con età d'esordio precoce e familiarità spesso positiva, e un gruppo di controllo il più simile possibile e pertanto composto da soggetti di giovane età, si è scelto di effettuare un confronto anche tra i pazienti con mutazione di GBA ed un gruppo di pazienti con malattia di Parkinson idiopatica che avessero

una durata di malattia paragonabile a quella dei carriers di mutazioni di GBA e un esordio più tardivo, pertanto privi di indicazioni all'esecuzione del test genetico.

I criteri applicati che hanno portato alla selezione dei 36 pazienti del gruppo di controllo sono:

- Età all'esordio superiore ai 50 anni (cut-off di YOPD);
- Durata di malattia simile a quella dei pazienti con mutazione per valorizzare gli aspetti che più spesso sono correlabili ad una malattia prolungata ed avanzata;
- Equa rappresentazione di entrambi i sessi.

La comparazione ha avuto come oggetto le medesime variabili qualitative della precedente analisi, valutate mediante il test di Fisher, mentre le variabili quantitative sono state analizzate con il test di Mann-Whitney.

Tra queste, sono state considerate la stadiazione Hoehn & Yahr, di cui sono state ottenute 8 risposte, la scala MDS-UPDRS III con 11 risposte, il test MMSE con 13 valori e MoCA con 12.

Il questionario sulla disautonomia, in virtù delle problematiche precedentemente citate riguardanti l'influenza delle comorbidità, non è stato somministrato per il rischio di una scarsa obiettività legata agli eccessivi fattori confondenti. In sostituzione è stata analizzata solo l'incidenza di incontinenza urinaria tenendo in considerazione eventuali patologie associate. Tutti i dati sono poi stati confrontati mediante il test esatto di Fisher.

## 5) RISULTATI

### 5.1 DESCRIZIONE DELLA COORTE DI PAZIENTI CON MUTAZIONE DI GBA

La coorte di pazienti analizzata in questa tesi comprende 20 pazienti affetti da malattia di Parkinson con mutazione di GBA, suddivisi in 13 individui di sesso maschile e 7 di sesso femminile.

I pazienti rappresentano l'11.76% di 170 pazienti affetti da malattia di Parkinson testati geneticamente sulla base di età d'esordio, caratteristiche cliniche di malattia e familiarità suggestive per una forma geneticamente determinata di malattia di Parkinson presso l'Azienda Ospedale Università di Padova. Al momento dell'analisi 3 pazienti della coorte erano deceduti, dunque è stato possibile prendere in considerazione tutti i dati inerenti agli aspetti genetici e clinici relativi alle indagini antecedenti la data della morte ma non si è potuto somministrare loro il questionario sulla disautonomia COMPASS 31, del quale, anche a causa dell'impossibilità di contattare un altro paziente, sussistono dunque solo 16 testimonianze all'interno del gruppo con mutazione.

#### 5.1.1 CARATTERISTICHE GENERALI

L'età media dei pazienti ancora in vita al momento attuale è pari a 58,76 anni con un range che va da 49 a 74 anni, mentre al momento dell'esordio della patologia l'età media era pari a 45,2 anni con un minimo di 18 ed un massimo di 65 anni. La durata di malattia in questi pazienti è pertanto mediamente considerevole ed è pari, in media, a 14,47 anni con un intervallo da 2 a 45 anni.

Inoltre, 5 pazienti hanno presentato un'età d'esordio inferiore ai 40 anni, mentre 10 pazienti hanno manifestato i primi sintomi prima dei 50 anni: poiché questi sono ritenuti alternativamente in letteratura<sup>19</sup> i cut-off validi per definire la presenza di Young Onset Parkinson's Disease, questa entità nosologica peculiare risulta molto ben rappresentata in questo gruppo.

Molto spesso in questi pazienti si è resa necessaria l'aggiunta di una strategia terapeutica avanzata: in 10 pazienti (50%), tra cui 2 successivamente deceduti, si è

ricorso all'impianto di DBS, mentre in 4 casi (20%) è avvenuto il passaggio a infusione duodenale di duodopa (PEG-J).

In 7 pazienti su 20 (35% dei casi) era rilevabile anamnesticamente una storia familiare positiva per malattia di Parkinson o patologie ad essa correlate quali parkinsonismi atipici, demenza a corpi di Lewy o malattia di Gaucher.

### 5.1.2 DESCRIZIONE GENETICA E MOLECOLARE

Tra i pazienti parkinsoniani, 16 presentano una variante monoallelica di GBA già precedentemente riportata in letteratura come patogena, uno ha una condizione di eterozigosi composta di due varianti del gene, una patogena e una non patogena, uno presenta in aggiunta alla mutazione di GBA anche una VUS di FBXO7 (p.Pro407Leu), uno infine riporta una VUS del gene SNCA, (p.Ala17Asp). L'unico soggetto portatore da due mutazioni patogene di GBA ha invece una diagnosi di malattia di Gaucher con sviluppo di malattia di Parkinson.

La mutazione nettamente più frequente in questa coorte, riscontrata in 9 pazienti, è la mutazione c.1226A>G (p.Asn409Ser), precedentemente come N370S, seguita dalla c.1342G>C (p.Asp448His), D409H, rilevata in 4 pazienti: entrambe sono alterazioni di tipo missenso. Ulteriori mutazioni missenso riscontrate in singoli pazienti sono la c.1448T > C, precedentemente nota come L444P (p.Leu483Pro), la c.370A>G, denominata M85V (p.Met124Val), la c.850C>A, o P245T (p.Pro284Thr), la c.754T>A, anche nota come P213I (p.Phe252Ile) e la c.256C>T (p.Arg86\*).

Sono state poi rilevate anche una variante di splicing, c.115+1G>A, definita IVS2+1, e due frameshift con produzione di un codone di stop prematuro: c.413delC (p.Pro138Leufs\*62) e c.1308dupT (p.Val437Cysfs\*32).

A differenza delle mutazioni appena citate, aventi tutte un significato patogeno, è stata individuata in un paziente anche una mutazione sinonima c.168C>T (p.Val56=), in grado di determinare la malattia di Parkinson in quanto associata ad un'altra mutazione di GBA in una condizione di eterozigosi composta.

In merito alla frequenza, come si evince dalla tabella sottostante (*Tabella I*), i cui dati sono stati ricavati dal database GnomAD, la mutazione N370S è la più rappresentata sia nella popolazione generale con una frequenza nell'ordine di

grandezza di  $10^{-3}$ , sia nella coorte analizzata (9/22 mutazioni riscontrate a carico di alleli di GBA, 41%), mentre la seconda mutazione globalmente più diffusa ( $10^{-3}$ ), ovvero la L444P, è stata rilevata solo in un soggetto della coorte (4%).

Una variante patogena che è stata riscontrata con maggiore frequenza rispetto alla popolazione generale è la D409H, presente 4 volte nei soggetti dello studio (18%) ma tipicamente più rara ( $10^{-4}$ ). Tutte le altre mutazioni risultano invece ancora più rare con frequenze di ordini di grandezza di  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  e ciascuna è stata rilevata una sola volta all'analisi genetica dei pazienti del gruppo di studio.

Infine, è importante evidenziare che, in accordo con quanto riportato nei database GnomAD e ClinVar, sono state riscontrate tre varianti sicuramente mild, determinanti forme non neuropatiche di malattia di Gaucher, ovvero N370S, M85V e c.256C>T, quattro varianti severe (L444P, D409H, P213I e IVS2+1), e una non patogena. Non sono invece state reperite informazioni a sufficienza per determinare la severità di P245T, c.413delC e c.1308dupT.

*Tabella I: Rappresentazione delle mutazioni di GBA della coorte di interesse*

MUTAZIONE	c.	p.	SEVERITA'	MAF	Frequenza
N370 S	1226A>G	Asn409Ser	Mild	632/282786 2,23e-3	9
L444P	1448T>C	Leu483Pro	Severa	324/250058 1,30e-3	1
D409H	1342G>C	Asp448His	Severa	32/250360 1,28e-4	4
IVS2+1	115+1G>A		Severa	20/282182 7,09e-5	1
M85V	370A>G	Met124Val	Mild	2/282870 7,07e-6	1
P213I	754T>A	Phe252Ile	Severa	12/282864 3,98e-6	1
	256C>T	Arg86*	Mild		1
P245T	850C>A	Pro284Thr		1/31394 3,19e-5	1
	168C>T	Val56=	Non pato	27/282732 9,55e-5	1
	413delC	Pro138Leufs*62			1
	1308dupT	Val437Cysfs*32			1

### 5.1.3 DESCRIZIONE FENOTIPICA: ASPETTI MOTORI

13 pazienti (65%) hanno riferito un esordio di tipo rigido-acinetico, 6 pazienti (30%) un esordio con tremore mentre uno (5%) ha manifestato per primi sintomi prettamente cognitivi (*Tabella I*).

Il 40% dei pazienti inoltre ha riportato un rischio di cadute e nel 25% dei casi è necessario ricorrere all'utilizzo di ausili nella mobilizzazione.

Rispettivamente nel 70% (14 soggetti) e nel 75% dei casi (15 soggetti) i pazienti hanno riferito discinesie più o meno chiaramente correlate all'assunzione di terapia dopaminergica e fluttuazioni motorie marcate; in 8 persone, invece, si manifestano anche movimenti distonici (40%).

*Tabella II: caratteristiche motorie nei pazienti con PD-GBA*

VARIABILE	NR. SOGGETTI	PERCENTUALE
Esordio rigido-acinetico	13	65%
Esordio con tremore	6	30%
Esordio cognitivo	1	5%
Rischio di cadute	8	40%
Utilizzo di ausili	5	25%
Discinesie	14	70%
Fluttuazioni motorie	15	75%
Distonia	8	40%

Il punteggio medio ottenuto dai soggetti con mutazione alla scala MDS-UPDRS III, è stato ricavato dall'indagine su 17 dei 20 pazienti della coorte ed è pari a 24,23 punti (range 2-52).

Il punteggio medio della scala Hoehn & Yahr di 14 soggetti tra i pazienti è pari a 2,5 con valori da 1 a 4 e si colloca dunque tra il secondo e il terzo stadio di malattia.

### 5.1.4 DESCRIZIONE FENOTIPICA: ASPETTI NON MOTORI

Dal punto di vista della sintomatologia non motoria (*Tabella II*), sono stati presi in considerazione i disturbi del sonno, i deficit cognitivi, la presenza di disturbi psichiatrici, la presenza di allucinazioni visive e disturbi di discontrollo degli

impulsi e la componente disautonomica, la quale verrà analizzata più approfonditamente in seguito essendo stata valutata separatamente mediante la somministrazione di una scala specifica.

In 16/20 pazienti (80%) sono segnalati sia disturbi psichiatrici sia alterazioni del sonno. Nel primo caso le problematiche più frequentemente segnalate sono state ansia (11), depressione (11) e apatia (9), mentre in un caso è stata segnalata l'evidenza di fluttuazioni dell'umore che potrebbero tuttavia essere correlate alla terapia farmacologica come off non motori. Si esclude dalla componente psichiatrica l'impulsività, in quanto analizzata come una componente a sé definita ICD (Impulse Control Disorder), che viene riferito da 8 soggetti (40%). Le allucinazioni visive compaiono invece in 7 soggetti (35%).

I principali disturbi del sonno citati sono invece insonnia, RBD e sindrome delle gambe senza riposo (*RLS, restless leg syndrome*).

Disturbi cognitivi sono stati soggettivamente riportati dai pazienti o, soprattutto, dai caregiver nel 75% dei casi, con un'impressione di demenza in 4 casi, mentre nei rimanenti soggetti è risultato prevalente l'MCI soprattutto di tipo mnesico ed attentivo.

*Tabella III: Parametri qualitativi non motori nel gruppo con mutazione di GBA*

VARIABILE	NR. SOGGETTI	PERCENTUALE
Disturbi psichiatrici	16	80%
Disturbi del sonno	16	80%
Disordini cognitivi	15	75%
ICD	8	40%
Allucinazioni visive	7	35%

I test neuropsicologici MMSE e MoCA, somministrati rispettivamente a 15 e 11 pazienti, hanno fornito una media degli score pari a 24,13 e 19,95 punti, rispettivamente.

### 5.1.5 CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO IN BASE ALLA SEVERITA' DELLA MUTAZIONE

All'interno del gruppo di pazienti con mutazione di GBA, i disturbi cognitivi risultano assenti in 2 pazienti con mutazione lieve e in 1 solo paziente con mutazione severa, nei 7 pazienti portatori di mutazioni lievi l'unico disturbo neuropsicologico evidenziato è il Mild Cognitive Impairment, mentre 3 dei 4 soggetti con riferiti sintomi compatibili con demenza rientrano nel gruppo con mutazioni severe e 1 nel gruppo di soggetti con mutazioni di significato ignoto.

L'età d'esordio è equivalente nei pazienti con mutazione severa e in quelli con mutazione lieve (46,71 vs 46,3), le allucinazioni visive (86% vs 78% con  $p=1$ ) e i disturbi psichiatrici (57% vs 22% con  $p=0,3024$ ) appaiono in entrambi i gruppi sovrapponibili, ma con frequenza maggiore nei pazienti con mutazioni severe.

Nell'ambito della disautonomia, invece, il punteggio medio ottenuto alla scala di valutazione COMPASS 31 dai pazienti con mutazione severa è maggiore di quello dei pazienti con mutazione lieve (44,515211 vs 31,588435), tuttavia senza una differenza statisticamente significativa (*U-value 14 con valore critico 6*).

### 5.2 CONFRONTO TRA PAZIENTI CON MUTAZIONE DI GBA E PAZIENTI CON TEST GENETICO NEGATIVO

La coorte di pazienti con mutazioni di GBA è stata successivamente messa a confronto (*Tabella III*) con una coorte di pazienti geneticamente negativi selezionati secondo i criteri elencati in precedenza.

Poiché il test genetico viene comunemente preso in considerazione in pazienti con esordio di malattia precoce e/o con familiarità positiva per disturbi del movimento, anche i pazienti del gruppo di controllo con risultato negativo al test genetico erano caratterizzati da una bassa età media ed all'esordio, e da una considerevole durata di malattia.

Nello specifico, è stato verificato con il test di Mann-Whitney con livello di significatività  $\alpha$  pari a 0,05 che il gruppo dei soggetti con mutazione e quello dei pazienti privi di mutazione, con un'età media attuale di 59 e 55,95 anni, presentano un'età confrontabile (*U=119 con valore critico 89,  $p=0,19706$* ), e che, avendo rispettivamente valori di 45,2 anni e 45,15 anni, non differiscono per età d'esordio



di malattia ( $U=189$  con valore critico 127,  $p=0,77948$ ). Inoltre, anche la durata di malattia, pari a 14,47 anni nel gruppo con mutazione ed a 10,65 anni nel gruppo senza mutazione, risulta statisticamente comparabile ( $U=123$  con valore critico 105,  $p=0,1556$ ).

Anche in questo gruppo si assiste ad un'equa distribuzione di entrambi i sessi (10 maschi e 10 femmine,  $p=0,5231$  rispetto al gruppo dei casi) e sono compresi alcuni pazienti in trattamento avanzato, 3 con DBS e 2 con PEG-J. Inoltre, 7 pazienti su 20 hanno un'età d'esordio minore di 40 anni e 7 pazienti minore di 50 anni: ciò significa che la forma YOPD è molto rappresentata e, essendo questa caratterizzata da differenze cliniche peculiari, risulta più complessa una efficace e significativa differenziazione tra i due gruppi, già per natura molto simili.

La familiarità positiva risulta paragonabile nei due gruppi secondo il test di Fisher (35% vs 15%,  $p=0,2733$ ).

*Tabella IV: Confronto generale GBA + vs genetica –*

VARIABILE	GBA +	GENETICA –	p (U-test)
Età attuale	59 (media)	55,95 (media)	<b>0,19706</b>
Età d'esordio	45, 2 (media)	45,15 (media)	<b>0,77948</b>
Durata di malattia	14,47 (media)	10,65 (media)	<b>0,1556</b>
Familiarità +	35%	15%	<b>0,2733</b>

### 5.2.1 VARIABILI DI CARATTERE MOTORIO

Il test esatto di Fisher è stato applicato alle diverse variabili qualitative (*Tabella IV*) citate in precedenza per cercare le eventuali differenze statisticamente significative tra malattia di Parkinson associata a mutazioni di GBA e malattia priva di fattori di rischio genetici e sostanzialmente ad esordio precoce.

I due gruppi di pazienti presentano sostanzialmente un profilo di malattia simile dal punto di vista motorio, senza differenze significative a livello di sintomo d'esordio, in entrambi i casi più frequentemente con rigidità-acinesia (65% vs 70%,  $p=1$ ) che con tremore (30% vs 30%,  $p=1$ ), rischio di cadute (40% vs 20%,  $p=0,3008$ ) e necessità di ausili (5% vs 25%,  $p=0,1818$ ).

Non sono visibili evidenti differenze nemmeno nell'ambito delle complicanze motorie di malattia quali discinesie (70% vs 65%,  $p=1$ ), fluttuazioni motorie (75% vs 55%,  $p=0,3203$ ) e distonia (40% vs 55%,  $p=0,5273$ ).

*Tabella V: confronto di variabili qualitative di tipo motorio GBA + vs genetica -*

VARIABILE	GBA +	GENETICA -	p (Fisher)
Esordio rigido-acinetico	65%	70%	1
Esordio con tremore	30%	30%	1
Rischio di cadute	40%	20%	0,3008
Utilizzo di ausili	5%	25%	0,1818
Discinesie	70%	65%	1
Fluttuazioni motorie	75%	55%	0,3203
Distonia	40%	55%	0,5273

Per quanto riguarda, infine, le scale di valutazione (*Tabella V*), si sottolinea che queste non sono state valutate per questioni logistiche e organizzative in tutti i soggetti, ma solo in campioni di essi: nella valutazione MDS-UPDRS III sono state ottenute 17 risposte nel gruppo con mutazione e 11 in quello senza, mentre nella stadiazione Hoehn & Yahr 14 nel primo gruppo e 8 nel secondo.

Nonostante il punteggio ottenuto dai pazienti con mutazione di GBA alla scala MDS-UPDRS III sia mediamente più elevato di quello dei pazienti con test genetico negativo (media 24,23 vs 17,8), la differenza al test di Mann Whitney non risulta statisticamente significativa ( $U$ -value 61,  $p=0,13104$ ).

L'unica differenza nelle caratteristiche motorie si riscontra nella scala di stadiazione Hoehn & Yahr in cui il valore medio del primo gruppo risulta maggiore di quello del secondo gruppo e in cui sussiste una differenza statistica significativa al Mann Whitney test (2,54 vs 1,75,  $U$ -value 21,5,  $p=0,00988$ ).

*Tabella VI: confronto di variabili quantitative motorie GBA + vs genetica -*

VARIABILE	GBA +	GENETICA -	p (U-test)
MDS-UPDRS III	24,23 (media)	17,8 (media)	0,13104
Hoehn & Yahr	2,54 (media)	1,75 (media)	<b>0,00988</b>

## 5.2.2 VARIABILI DI CARATTERE NON MOTORIO

La più importante differenza riscontrabile dal punto di vista clinico all'interno dei disturbi di carattere non motorio è la prevalenza della sintomatologia cognitiva, riferita soggettivamente dai pazienti o dai caregiver al momento della visita, nel gruppo dei pazienti con mutazione, nettamente superiore rispetto a quella del gruppo di controllo (75% vs 15%,  $p=0,0003$ , OR 5), sia per quanto riguarda i sintomi indicativi di Mild Cognitive Impairment (50% vs 25%,  $p=0,0407$ , OR 2), sia per quanto riguarda quelli compatibili con demenza conclamata (25% vs 0,  $p=0,0471$ ).

Le valutazioni cognitive e neuropsicologiche, necessarie per effettuare una precisa diagnosi, (Tabella VI) non hanno riscontrato tuttavia una differenza statisticamente significativa in quanto non sono state raccolte in un numero sufficiente di soggetti per fornire un'idea rappresentativa del quadro. Il test MMSE, di cui sono presenti 15 risposte nel gruppo con mutazione di GBA e 11 nel gruppo di controllo, fornisce risultati statisticamente comparabili seppur diversi e rispettivamente sotto e sopra il cut-off per la definizione di disturbo cognitivo (media 24,13 vs 27,35,  $U\text{-value}=36$  con valore critico=34,  $p=0,06876$ ); allo stesso modo con il test MoCA non si assiste ad una differenza significativa dal punto di vista statistico (media 19,95 vs 24,72,  $U\text{-value}=21$  con valore critico=16,  $p=0,12356$ ).

Tabella VII: confronto di variabili quantitative non motorie GBA + vs genetica -

VARIABILE	GBA +	GENETICA -	p (U-test)
MMSE	24,13 (media)	27,35 (media)	0,06876
MoCA	19,95 (media)	24,72 (media)	0,12356

Il confronto (Tabella VII) con il gruppo di controllo con test genetico negativo ed esordio di malattia anticipato, nonostante i valori riscontrati nel gruppo con mutazione siano sempre di molto superiori, nei limiti dell'esigua numerosità campionaria, non mostra ulteriori differenze statistiche né per quanto riguarda le patologie psichiatriche (80% vs 65%,  $p=0,4801$ ), né i disordini del controllo degli impulsi (40% vs 25%,  $p=0,5006$ ), né le allucinazioni (35% vs 10%,  $p=0,1274$ ), né i disturbi del sonno (80% vs 55%,  $p=0,176$ ).

Tabella VIII: confronto di variabili qualitative non motorie GBA + vs genetica -

VARIABILE	GBA +	GENETICA -	p (Fisher)
Alterazioni cognitive	75%	15%	<b>0,0003</b>
MCI	50%	25%	<b>0,0407</b>
Demenza	25%	0	<b>0,0471</b>
Pato. psichiatriche	80%	65%	0,4801
ICD	40%	25%	0,5006
Allucinazioni visive	35%	10%	0,1274
Disturbi del sonno	80%	55%	0,176

### 5.2.2.1 Confronto sulla disautonomia

I due gruppi sono stati infine confrontati andando a considerare i risultati riportati da ciascuna coorte nel test di valutazione della disautonomia COMPASS 31.

Sono stati raccolti 16 risultati nel gruppo dei pazienti con mutazione e 18 in quello di controllo. Il risultato medio raggiunto nel primo gruppo è pari a 34,12400723, quello del secondo gruppo è invece 20,19091667.

Il test di Shapiro-Wilk ha evidenziato una distribuzione normale nel gruppo di interesse ( $p=0,824$ ) (Figura 6) ma una distribuzione non normale nel gruppo di controllo ( $p=0,0001278$ ) (Figura 7), motivo per cui si è scelto di utilizzare il test non parametrico di Mann-Whitney.

Figura 6: Distribuzione risultati COMPASS 31 GBA +  
COMPASS 31: DISAUTONOMIA GBA

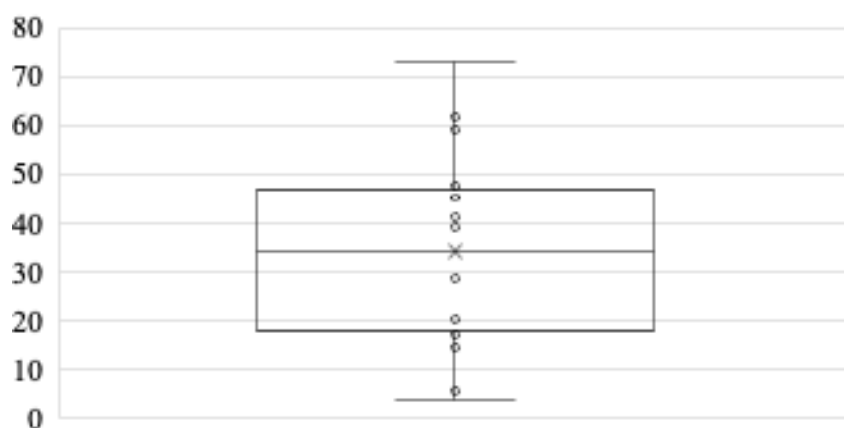
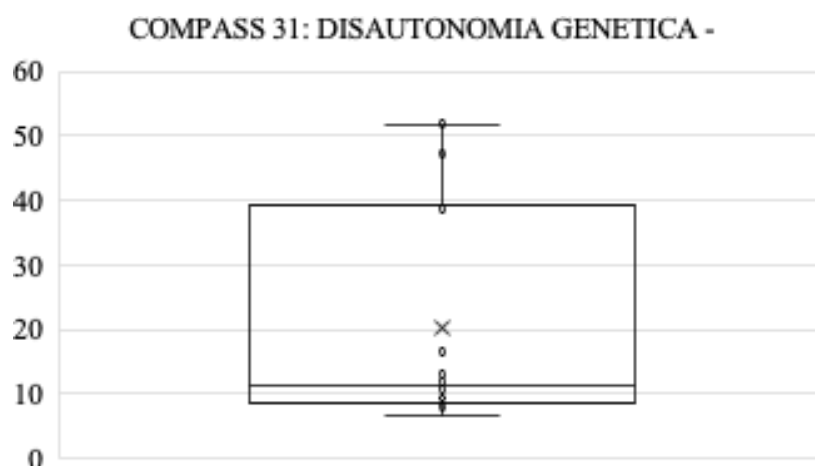


Figura 7: Distribuzione risultati COMPASS 31 genetica -



Il test di Mann-Whitney (*Tabella VIII*) dimostra una differenza significativa tra i due punteggi (*test a due code: U-value=83 con valore critico=86,  $p=0,03662$* ).

*Tabella IX: Confronto risultati COMPASS 31 GBA + vs genetica -*

	GBA +	GENETICA -	p (U-test)
COMPASS 31	34,12400723 (media)	20,19091667 (media)	<b>0,03662</b>

### 5.3 CONFRONTO TRA PAZIENTI CON MUTAZIONE DI GBA E MALATTIA DI PARKINSON IDIOPATICA AD ESORDIO TARDIVO

Per concludere, allo scopo di verificare le eventuali differenze tra la forma legata alle mutazioni del gene GBA ed una forma diversa da quella ad esordio precoce, si è deciso di effettuare un confronto tra i pazienti con mutazione di GBA e quelli con malattia di Parkinson idiopatica con età media attuale pari a 76,6 ed età media all'esordio pari a 66,5, ma con durata media di malattia pari a 9,9 anni, il più paragonabile possibile, nei limiti del campione a disposizione, a quella della coorte di interesse secondo il test di Mann-Whitney ( $p=0,01684$ ).

Entrambi i sessi sono equamente rappresentati anche nel gruppo di controllo composto da 20 uomini e 16 donne ( $p=0,5772$  rispetto al gruppo di interesse). Un paziente è in trattamento avanzato con infusione duodenale di Duodopa.

La familiarità, infine, non risulta statisticamente diversa tra i due gruppi (35% vs 17%,  $p=0,1859$ ).

### 5.3.1 VARIABILI DI CARATTERE MOTORIO

Le diverse variabili qualitative (*Tabella IX*) già valutate nelle precedenti indagini sono state analizzate con il test esatto di Fisher allo scopo di evidenziare eventuali differenze statisticamente significative tra malattia di Parkinson associata a mutazioni di GBA e forma idiopatica ad esordio più tardivo.

Non si evidenziano differenze significative in merito ai sintomi d'esordio, né per quanto riguarda la forma rigido-acinetica (65% vs 52,8%,  $p=0,4128$ ), né per quanto riguarda quella con tremore (30% vs 44%,  $p=0,3942$ ).

Non sono state riscontrate diversità nemmeno a livello di incidenza di cadute (40% vs 30%,  $p=0,5606$ ) o di necessità di ausili (25% vs 27,8%,  $p=1$ ).

Importanti differenze statisticamente rilevanti si notano invece nell'ambito delle complicanze motorie di malattia, ovvero lo sviluppo di discinesie (70% vs 33%,  $p=0,0121$ , *OR* 2,12), distonia (40% vs 5%,  $p=0,0024$ , *OR* 8) e fluttuazioni motorie (75% vs 39%,  $p=0,0128$ , *OR* 1,92), prevalenti nel gruppo dei pazienti con mutazione.

*Tabella X: Confronto di variabili qualitative motorie GBA + PD idiopatico*

VARIABILE	GBA +	PD IDIOPATICO	p (Fisher)
Esordio R/A	65%	52,8%	0,4128
Esordio T	30%	44%	0,3942
Rischio di cadute	40%	30%	0,5606
Ausili	25%	27,8%	1
Discinesie	70%	33%	<b>0,0121</b>
Distonia	40%	5%	<b>0,0024</b>
Fluttuazioni motorie	75%	39%	<b>0,0128</b>

La stadiazione Hoehn & Yahr (*Tabella X*), confrontata in un campione di 8 controlli, ha dimostrato una differenza significativa (valori medi 2,54 vs 1,94, *U-value*=25,5 con valore critico=29,  $p=0,02852$ ), mentre il contrario avviene

all'analisi del MDS-UPDRS III (24,23 vs 16,18,  $U\text{-value}=62,5$  con valore critico=51,  $p=0,15272$ )

*Tabella XI: confronto di variabili quantitative motorie GBA + vs PD idiopatico*

VARIABILE	GBA +	PD IDIOPATICO	p (U-test)
MDS-UPDRS III	24,23 (media)	16,18 (media)	0,15272
Hoehn & Yahr	2,54 (media)	1,94 (media)	<b>0,02852</b>

### 5.3.2 VARIABILI DI CARATTERE NON MOTORIO

Il gruppo di pazienti con mutazione di GBA (*Tabella XI*) presenta un'incidenza di disturbi cognitivi soggettivamente riferiti significativamente maggiore rispetto ai pazienti con malattia idiopatica (75% vs 22%,  $p=0,0002$ , OR 3,4), sia in termini di Mild Cognitive Impairment (50% vs 11%,  $p=0,0027$ , OR 4,54), sia in termini di demenza (11% vs 0,  $p=0,0132$ ); lo stesso avviene anche per lo sviluppo di disturbi psichiatrici, presenti nell'80% dei soggetti con mutazione e nel 25% di quelli con malattia di Parkinson idiopatica ( $p=0,0002$ , OR 3,2).

Non si riscontrano invece differenze nell'ambito dei disturbi del discontrollo degli impulsi (40% vs 19%,  $p=0,1218$ ), delle allucinazioni (35% vs 19%,  $p=0,2163$ ) e dei disturbi del sonno (80% vs 66%,  $p=0,3646$ ).

*Tabella XII: Confronto di variabili qualitative non motorie GBA + vs PD idiopatico*

VARIABILE	GBA +	PD IDIOPATICO	p (Fisher)
Alterazioni cognitive	75%	22%	<b>0,0002</b>
MCI	50%	11%	<b>0,0027</b>
Demenza	11%	0	<b>0,0132</b>
Disturbi psichiatrici	80%	25%	<b>0,0002</b>
ICD	40%	19%	0,1218
Allucinazioni visive	35%	19%	0,2163
Disturbi del sonno	80%	66%	0,3646
Incontinenza	60%	36%	0,1006

In conclusione, la comparazione tra i test cognitivi (*Tabella XII*) MMSE (24,13 vs 26,86,  $U\text{-value}=61,5$  con valore critico=54,  $p=0,101$ ) e MoCA (19,95 vs 24,1475,  $U\text{-value}=39$  con valore critico 33,  $p=0,1031$ ) non ha fornito risultati rilevanti dal punto di vista statistico, probabilmente per la bassa numerosità campionaria dello studio.

*Tabella XIII: confronto di variabili quantitative non motorie GBA + vs PD idiopatico*

VARIABILI	GBA +	PD IDIOPATICO	p (U-test)
MMSE	24,13 (media)	26,86 (media)	0,101
MoCA	19,95 (media)	24,1475 (media)	0,1031

### 5.3.2.1 Confronto sulla disautonomia

Poiché, come precedentemente spiegato, un questionario sulla disautonomia svolto in questa fascia d'età rischia di essere fuorviante a causa delle eccessive comorbidità, si è preferito non affrontare questa tematica in questa sede. L'unico parametro analizzato, con l'accortezza di considerare le altre patologie presenti, è stato quello relativo all'incontinenza urinaria la quale è stata riferita come indipendente e più o meno grave in 12 soggetti (60%) con mutazione di GBA ed in 13 soggetti (36%) con Parkinson idiopatico non ad esordio precoce, senza tuttavia una correlazione statistica confermata ( $p=0,1006$ ).



## 6) DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio è stata caratterizzata clinicamente e molecolarmente una coorte di pazienti affetti da malattia di Parkinson con evidenza all'analisi genetica di mutazioni del gene GBA. La frequenza mutazionale in tale gene, pari all'11.76% nella coorte di pazienti testati presso il nostro centro, appare essere lievemente inferiore a quanto riportato nell'unico studio italiano presente in letteratura (Petrucci et al., 2020; 14.3%) anche se sostanzialmente in linea con esso.

In funzione di una corretta e ponderata analisi dei risultati ottenuti da questo studio appare doverosa una premessa in merito alla numerosità campionaria; essa, consistente in 20 soggetti con malattia di Parkinson associata a mutazioni del gene GBA, seppur apparentemente esigua, rappresenta un campione ampio se si considera la natura monocentrica dello studio e la frequenza di una patologia correlata ad una mutazione su un singolo gene. Inoltre, ciò che rende tale numero concettualmente ancora più significativo è il fatto che tali pazienti con mutazione di GBA afferiscano tutti alla medesima Azienda Ospedaliera del Nord-Est dell'Italia, facendo intendere quanto effettivamente questa mutazione sia diffusa nella popolazione generale di quest'area del nostro paese, che non è mai stata oggetto di studi genetici su mutazioni di GBA e malattia di Parkinson. La ridotta numerosità campionaria rende le considerazioni statistiche legate alle nostre osservazioni gravate da limiti, ed un obiettivo futuro consisterà nell'ampliamento della casistica per rendere la potenza statistica dello studio maggiore di quella attuale. Inoltre, per gli stessi motivi, i risultati del nostro studio non appaiono essere sempre completamente in linea con quanto precedentemente riportato in letteratura.

Lo studio ha incluso dapprima una descrizione genetica e fenotipica della coorte con mutazione di GBA, ed in seguito un confronto con 1) un gruppo di pazienti geneticamente negativi con età d'esordio confrontabile; ed infine 2) con un gruppo di pazienti con malattia idiopatica ad esordio più tardivo con durata di malattia confrontabile. Questo iter è stato dettato dalla necessità di comprendere il ruolo della mutazione di GBA sia come fattore di rischio di malattia, sia come potenziale determinante di una forma di malattia con specifici connotati. La scelta di appaiare due opere di confronto parallele ha lo scopo di ridurre i fattori confondenti che possono associarsi ai due gruppi di controllo.

È noto dalla letteratura che le mutazioni di GBA determinano l'insorgenza di una patologia ad esordio più precoce accompagnata da sintomi non motori più severi, progressione più rapida e minor tasso di sopravvivenza, fungendo dunque da fattore prognosticamente negativo. Tra i sintomi non motori, quelli che risultano prevalenti in questa tipologia di malattia sono i deficit cognitivi, i disturbi psichiatrici, la disfunzione autonoma, la disabilità motoria e la disfagia<sup>36</sup>. In particolare, si percepisce una più veloce progressione in ambito motorio e di stadiazione della patologia, nonché cognitivo, coerentemente con la maggior diffusione di corpi di Lewy a carico della neocorteccia nei pazienti affetti da mutazione<sup>42</sup>.

In accordo con quanto affermato dalla letteratura e quanto riportato nella parte introduttiva, anche la coorte di pazienti con mutazione di GBA analizzata in questo studio è caratterizzata da un'età media di insorgenza precoce (45,2 anni), da un'importante prevalenza di complicanze non motorie quali disordini cognitivi (75%), sintomi psichiatrici (80%), disturbi del sonno (80%), allucinazioni (35%) e disordini del controllo degli impulsi (40%), ed infine da un'importante disabilità motoria rapidamente progressiva con rilevante rischio di cadute (40%) ed accompagnata da frequente sviluppo di discinesie (70%), fluttuazioni motorie (75%) e distonia (40%). Come evidenziato in studi precedenti, inoltre, i sintomi d'esordio riscontrati in due terzi dei casi sono rigidità ed acinesia (65%), mentre il tremore è presente all'esordio in un terzo dei pazienti.

La disautonomia è inoltre un'altra caratteristica molto rilevante nei portatori di questo tratto genetico, come dimostrato dall'elevato punteggio medio ottenuto alla scala di valutazione COMPASS 31 pari a 34,12.

I punteggi ottenuti dai pazienti nei test di valutazione cognitiva sono entrambi al di sotto dei cut-off indice di declino cognitivo (MMSE 24,13 e MoCA 19,95), mentre la scala MDS-UPDRS III ha un punteggio medio di 24,23.

Coerentemente con quanto riportato in tutti gli articoli, infine, la progressione verso gli stadi più avanzati di malattia è più rapida, come dimostra lo stadio medio della scala di H&Y (2,54).

Per stabilire se esistano delle differenze tra la forma GBA-PD e forme di malattia di Parkinson geneticamente indeterminata, è stato effettuato un confronto con due gruppi di controllo.

Per interpretare correttamente i dati ottenuti, è importante considerare che la maggior parte dei pazienti coinvolti nel primo confronto presentano una lunga durata di malattia (media rispettivamente di 14,47 e 10,65 anni), gravata<sup>3</sup> per la sua natura progressiva e degenerativa da off severi, discinesie, disfagia, disartria, instabilità posturale, aumentata incidenza di cadute, freezing, declino cognitivo, sintomi psichiatrici, allucinazioni, disturbi del sonno e disautonomia.

Inoltre, 6 dei pazienti privi di mutazione e 4 di quelli con test positivo hanno un'età all'esordio compresa tra 21 e 40 anni, rientrando dunque a pieno titolo nella categoria definibile Young Onset Parkinson's Disease (YOPD); 6 e 9 hanno un'età al momento dell'insorgenza di malattia compresa tra i 41 e i 50 anni<sup>19</sup>, nella zona grigia tra YOPD e Late Onset Parkinson's Disease, mentre un paziente con mutazione, avendo manifestato la malattia prima dei 21 anni viene compreso nella definizione di Parkinson giovanile.

Questa precisazione appare doverosa in quanto, a prescindere dalla presenza o meno della mutazione del gene GBA, la malattia di Parkinson ad esordio precoce ha delle specifiche peculiarità genotipiche e fenotipiche che la differenziano dalla forma senile, rendendo più complesso stabilire delle ulteriori minime differenze tra queste due tipologie di malattia.<sup>43</sup>

Oltre alla maggior incidenza di mutazioni genetiche e storia familiare positiva (20% dei casi in YOPD, 6,9% nella forma Late Onset), risultano molto importanti anche alcune caratteristiche cliniche.

Per esempio, YOPD esordisce più spesso con rigidità e crampi dolorosi e meno frequentemente con disturbi posturali, mentre differenze in merito al tremore rispetto alla forma senile sono ancora dibattute e non precisamente evidenziate.

Spesso, negli stadi precoci di malattia, ancora prima dell'introduzione della terapia con levodopa, i pazienti presentano distonia più comunemente indotta dal movimento e riscontrata a livello del piede e dell'arto inferiore.<sup>43</sup> Questa forma di malattia, inoltre, è generalmente caratterizzata da una lenta progressione motoria, da una più lunga fase presintomatica, correlata alla probabile esistenza di meccanismi di compenso più efficienti in giovane età che permettono al sistema dopaminergico del paziente di resistere più a lungo prima che si sviluppino i sintomi motori, da minore interessamento cognitivo, probabilmente correlato al minore interessamento del caudato all'imaging, e maggiori fluttuazioni motorie e discinesie. In relazione a quest'ultime, in particolare, si sottolinea che le fluttuazioni

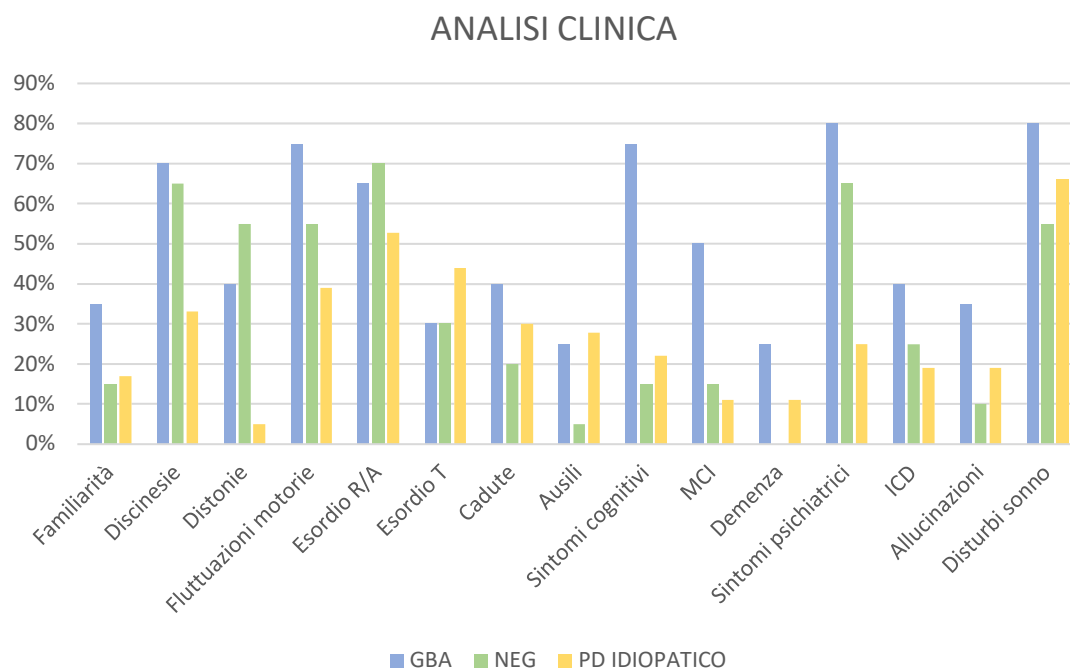
e le discinesie indotte da trattamento con levodopa tendono a comparire prima nella forma giovanile rispetto a quella senile ed a diminuire con il passare degli anni, motivo per cui la DBS si rivela un'alternativa molto valida per trattare le complicanze motorie nel YOPD.<sup>43</sup> La forma giovanile è meno caratterizzata da cadute, disturbi del sonno, disordini gastrointestinali ed urinari, mentre più spesso vengono riferite sindrome delle gambe senza riposo e disfunzione sessuale. Più frequentemente, inoltre, queste persone soffrono di depressione (due volte in più) e probabilmente<sup>43</sup> anche di altre problematiche psichiatriche (demenza, ansia, psicosi) e, se trattate con dopamino agonisti, sviluppano più frequentemente disordini nel controllo degli impulsi.

Quanto appena scritto è coerente con quanto riscontrato all'analisi dei dati (*Figura 8*): pur non essendo stato possibile comprendere nello studio anche una comparazione tra YOPD e PD idiopatico, non essendo i due gruppi perfettamente modellati per questa esigenza ma eterogenei per età, si nota che i due gruppi del primo confronto, con e senza mutazione, entrambi caratterizzati da un'età d'esordio precoce, presentano un'incidenza considerevole di disturbi psichiatrici (80 e 65% dei casi,  $p=0,4801$ ), disordini del controllo degli impulsi (40% e 25%,  $p=0,5006$ ), discinesie (70% e 65%,  $p=1$ ), fluttuazioni motorie (75% e 55%,  $p=0,3203$ ) e distonia (40% e 55%,  $p=0,5273$ ).

In entrambi i casi, inoltre, il sintomo d'esordio più frequente è la rigidità (65% e 70%,  $p=1$ ) e non il tremore (30% e 30%,  $p=1$ ) e si riscontra frequentemente un'anamnesi familiare positiva (35% e 15%,  $p=0,2733$ ). Il fatto che la familiarità non mostri una differenza statistica tra i due gruppi è coerente con quanto espresso dagli studi scientifici, secondo cui nella maggior parte dei casi la mutazione compare in maniera sporadica<sup>23</sup>.

A differenza di quanto riportato in letteratura, invece, in entrambi i gruppi sono piuttosto frequentemente riferiti anche i disturbi del sonno (80% e 55%,  $p=0,176$ ), i quali tuttavia risultano comunque tipici di una forma di malattia a decorso prolungato come quella analizzata, così come le allucinazioni (35% e 10%,  $p=0,1274$ ).

Figura 8: Comparazione delle caratteristiche cliniche in pazienti con mutazione di GBA, test genetico negativo e PD idiopatico



Per tutte queste caratteristiche che dovrebbero risultare più frequenti nei pazienti con mutazioni di GBA, per quanto l'incidenza netta appaia sempre maggiore nel gruppo di interesse, l'esecuzione di un confronto con un gruppo di pazienti principalmente con forma YOPD non fornisce dei risultati che indichino una differenza statisticamente significativa. Ciò è verosimilmente legato alla bassa numerosità del campione, che limita l'ottenimento di risultati robusti, e alla presenza di alcune caratteristiche peculiari anche nella forma di malattia ad esordio precoce con cui è stato effettuato il confronto.

In accordo con pregressi lavori clinici che testimoniano come l'aspetto caratterizzante la forma di malattia legata a mutazione di GBA sia quello non motorio, come verrà evidenziato successivamente, si apprezza dai risultati raccolti che la scala di valutazione MDS-UPDRS non differisce in un gruppo rispetto all'altro, seppur con le doverose riflessioni in merito alla numerosità dei dati.

Un dato interessante, invece, è la differenza riscontrata nel punteggio di stadiazione Hoehn & Yahr che, a parità di durata di malattia, risulta più alto nei pazienti GBA-PD rispetto ai controlli (2,54 vs 1,75,  $p=0,00988$ ), in accordo con gli studi che

affermano che la malattia di Parkinson associata a mutazione di GBA progredisce più rapidamente.

Un altro aspetto di fondamentale importanza è quello riguardante la sintomatologia cognitiva, tipica della malattia legata a mutazione di GBA. Secondo gli studi precedentemente citati, infatti, la presenza di questa alterazione genetica causa l'insorgenza di una tipologia di malattia di Parkinson più pesantemente gravata da sintomi non motori ed in particolar modo da declino cognitivo, mentre questo tipo di disturbo non sembra colpire i pazienti con malattia ad esordio precoce globalmente intesa, causata, ad esempio, da mutazioni del gene Parkina o PINK1. I dati raccolti in questa sede sembrano avvalorare questa affermazione in quanto l'incidenza di declino cognitivo soggettivamente lamentato dal paziente o caregiver appare nettamente superiore nei soggetti con mutazione genetica (75%) rispetto al gruppo di controllo (15%) ed essendo entrambi i gruppi caratterizzati da un'età d'insorgenza simile si può concludere che sia la presenza di GBA mutato a determinare questa differenza clinica statisticamente rilevante ( $p=0,0003$ ).

Il fatto che la comparazione dei risultati dei test neuropsicologici (MMSE: media 24,13 vs media 27,35 con  $p=0,06876$ ; MoCA: media 19,95 vs media 24,72 con  $p=0,12356$ ) non mostri una oggettiva differenza rilevante tra i due gruppi, non deve essere interpretato come un'incoerenza, perché è verosimilmente un risultato inficiato dalla bassa numerosità di pazienti con risultati ai test reperibili.

I risultati ottenuti nelle valutazioni dei disturbi disautonomici sono in linea con quanto precedentemente riportato in letteratura. La disfunzione autonoma, infatti, è maggiormente presente nei pazienti che presentano una mutazione a carico del gene GBA.

In linea con questa precedente osservazione, la coorte di soggetti con test genetico positivo ha ottenuto alla scala COMPASS 31 un punteggio medio (34,12) nettamente superiore rispetto alla coorte con test negativo (20,19), con una distribuzione più spostata verso valori elevati.

I risultati del primo gruppo alla scala di valutazione della disautonomia COMPASS 31 sono ritenuti significativamente maggiori dal punto di vista statistico rispetto a quelli del secondo gruppo, dimostrando la possibile esistenza di una correlazione tra la presenza della mutazione del gene GBA e l'esistenza di un'importante disfunzione autonoma ( $p=0,03662$ ). Questo studio ha pertanto valutato in

maniera omogenea i disturbi disautonomici con una scala dedicata e facilmente somministrabile.

Poiché tuttavia è impossibile non considerare il fatto che un confronto con una patologia che già presenta delle alterazioni cliniche rispetto alla forma standard, quale può essere lo YOPD, può portare ad una comparazione non effettivamente reale ma possibilmente non obiettiva, è stato eseguito un secondo confronto (*Figura 8*) tra pazienti con mutazione di GBA e pazienti con malattia di Parkinson idiopatica con durata prolungata ed esordio oltre i 50 anni, con lo scopo di stabilire quali caratteristiche fossero eventualmente legate alla presenza della mutazione.

I pazienti con mutazione rilevata al test genetico hanno dimostrato in questo frangente di soffrire di un numero maggiore di problematiche sia di tipo motorio che di tipo non motorio. Si può dunque affermare che un'alterazione di GBA, rispetto alla classica malattia di Parkinson idiopatica, non ad esordio anticipato ma con durata sostenuta, porta sul versante non motorio ad un'aumentata presenza di complicanze psichiatriche (80% vs 25%,  $p=0,0002$ ), mentre su quello non motorio anche ad un incremento di discinesie (70% vs 33%,  $p=0,0121$ ), distonia (40% vs 5%,  $p=0,0024$ ) e fluttuazioni motorie (75% vs 39%,  $p=0,0128$ ). Aumentato è, inoltre, anche lo stadio di malattia indicante la disabilità ed espresso dalla scala Hoehn & Yahr, in accordo con gli studi<sup>42</sup> secondo cui la malattia associata a mutazione di GBA progredisce più rapidamente agli stadi avanzati (valori medi 2,54 vs 1,94,  $U\text{-value}=25,5$  con  $\text{valore critico}=29$ ,  $p=0,02852$ ).

Anche in questo caso l'esordio avviene in entrambi i casi principalmente con rigidità ed acinesia piuttosto che con tremore, ma senza differenze significative ( $p=0,4128$  e  $p=0,3942$ ).

Neppure nel confronto con la seconda coorte con malattia idiopatica, come affermato nel precedente confronto, sussiste una diversità analitica tra i valori medi alla scala MDS-UPDRS parte III (24,23 vs 16,18,  $U\text{-value}=62,5$  con  $\text{valore critico}=51$ ,  $p=0,15272$ ).

Si confermano ancora più rappresentati anche l'ICD, le allucinazioni e i disturbi del sonno se si considerano le incidenze nette, ma non sussistono differenze confermate all'analisi statistica che permettano di trarre delle conclusioni certe in merito a questi parametri.

L'instabilità posturale, valutata empiricamente attraverso il rischio di cadute, non risulta aumentata nei pazienti GBA positivi con durata di malattia prolungata, che è essa stessa un fattore di rischio per lo sviluppo di questa caratteristica.

Un'ulteriore importante conferma arriva invece dalla comparazione dell'aspetto cognitivo tra il gruppo dei pazienti mutati e quello dei pazienti con Parkinson idiopatico con esordio senile: anche in questo frangente, nonostante i pazienti più anziani possano andare incontro a performance cognitive più scadenti, il gruppo GBA-PD mostra maggiore incidenza di declino globale rispetto al gruppo di controllo (75% vs 22%,  $p=0,0002$ ).

Nonostante quanto appena affermato, tuttavia, i test cognitivi non dimostrano differenze significative, per quanto i punteggi del gruppo con mutazione siano più bassi di quelli con malattia idiopatica in entrambe le valutazioni (MMSE: 24,13 vs 26,86,  $U\text{-value}=61,5$  con valore critico=54,  $p=0,101$ ; MoCA: 19,95 vs 24,1475,  $U\text{-value}=39$  con valore critico 33,  $p=0,1031$ ). Nuovamente ciò viene imputato al fatto che queste scale sono state eseguite solo in un sottogruppo di pazienti e potrebbero dunque essere non indicative a causa della scarsa numerosità.

La doppia conferma ottenuta dai due confronti permette di affermare con relativa sicurezza che, in accordo con quanto affermato unanimemente in letteratura, la presenza di una mutazione nel gene GBA causa l'insorgenza di una patologia gravata da una sintomatologia cognitiva di maggiore entità.

Per quanto riguarda, infine, la componente disautonomica, presa in considerazione unicamente nella coorte con mutazione di GBA ed in quella senza mutazione, il fatto che i punteggi ottenuti alla scala di valutazione COMPASS 31 siano significativamente più alti nel primo gruppo dimostra che questa è senza dubbio una caratteristica connessa alla mutazione di GBA, una forma di malattia con un importante tasso di complicanze non motorie che rende la condizione clinica di questi pazienti molto invalidante.

Un confronto con pazienti più anziani e forma di patologia idiopatica non è indicativo quanto può esserlo quello con pazienti di pari e giovane età, tuttavia il risultato di questa tesi dimostra che la presenza della mutazione correla con una forma di malattia caratterizzata da maggior rischio di problematiche



disautonomiche. La forma di valutazione scelta è fondata sostanzialmente sul self-assessment del paziente o dei care-giver che possono facilmente obiettivare e riportare le caratteristiche tipiche della disautonomia, ovvero in particolar modo l'ipotensione ortostatica, le alterazioni circolatorie e secretomotorie, i disturbi visivi e gastrointestinali. I risultati forniti dal questionario somministrato sono in linea con quanto affermato dalla letteratura, tuttavia ulteriori studi in cui le più rilevanti problematiche disautonomiche possano essere verificate con gli specifici test precedentemente citati potrebbero contribuire ulteriormente a verificare la veridicità di quanto esposto.

Un ulteriore aspetto meritevole di trattazione riguarda la differenza tra le mutazioni severe e le mutazioni lievi.

I differenti effetti delle diverse mutazioni di GBA lievi o severe devono essere presi in considerazione in quanto potrebbero rendere conto della grande variabilità che si verifica nei soggetti con malattia di Parkinson sia dal punto di vista clinico che da quello del tasso di sopravvivenza, il quale sembrerebbe, in accordo con i primi studi condotti in merito, ridotto in presenza di mutazioni severe<sup>44</sup>.

Tra le mutazioni riscontrate nei pazienti analizzati quelle certamente riconosciute come lievi sono c.1226A>G (p.Asn409Ser), nota come N370S, c.370A>G (p.Met124Val), nota come M85V, e c.256C>T (p.Arg86\*), mentre quelle certamente note come severe sono c.115+1G>A (IVS2+1), c.1342G>C (p.Asp448His), anche denominata D409H/D448H, c.754T>A (p.Phe252Ile) o P213I e c.1448T > C (p.Leu483Pro), una delle più diffuse e nota come L444P.

Nonostante non sia facile eseguire una differenziazione specifica, essendo state riscontrate alcune mutazioni di carattere ignoto, ciò che si può fare è andare a verificare se sussistono particolarità cliniche rilevanti in linea o in disaccordo con la letteratura.

L'aspetto più importante riguarda nuovamente i disturbi cognitivi: nonostante questi siano assai frequenti in tutti i pazienti portatori di mutazione, è interessante evidenziare che 2 pazienti con mutazione lieve non hanno finora presentato alcuna sintomatologia cognitiva, mentre questo si verifica in un solo paziente con mutazione severa. Inoltre, nei 7 pazienti affetti dalle mutazioni lievi appena citate si riscontra unicamente un quadro di mild cognitive impairment, mentre i quadri di

demenza conclamata compaiono solo nelle persone che presentano una delle mutazioni severe (o di significato ignoto in un caso).

Questa deduzione, seppur condotta su un campione incompleto di pazienti, è in linea con quanto affermato in alcuni studi secondo cui il tipo di mutazione influenza l'aspetto cognitivo<sup>26</sup>. Poiché il medesimo studio riporta anche un incremento ulteriore di allucinazioni, sintomi psichiatrici e sintomi disautonomici ed un'anticipazione diagnostica, sono stati messi a confronto i dati dei pazienti con mutazioni certamente lievi e severe a disposizione. Nessuno di questi confronti dimostra una differenza statisticamente significativa, nonostante sia le allucinazioni che i disturbi psichiatrici siano molto ben rappresentati nei pazienti con mutazioni severe (rispettivamente 57% vs 22% con  $p=0,3024$  e 86% vs 78% con  $p=1$ ). L'età di insorgenza, invece, risulta identica (46,71 vs 46,3).

Per quanto riguarda la valutazione COMPASS 31, invece, sebbene non sussista una differenza statisticamente significativa (*U-value 14 con valore critico 6*) il punteggio medio ottenuto dai pazienti con mutazione severa (44,515211) è discretamente maggiore di quello dei pazienti con mutazione lieve (31,588435).

Un'analisi più approfondita della correlazione genotipo-fenotipo risulta complessa, in quanto alcune varianti hanno un significato incerto e, in alcuni casi, coesistono con mutazioni su altri geni, rendendo difficile l'esecuzione di un'indagine obiettiva. Inoltre, la numerosità campionaria molto esigua interferisce con la possibilità di determinare delle conclusioni significative.

In conclusione, questo lavoro si inserisce in un quadro di grande attenzione globale rivolta alla malattia di Parkinson legata a mutazioni del gene GBA.

Nonostante i limiti relativi alla numerosità campionaria ed alla necessità di integrazione dei risultati con quanto ottenuto da differenti studi scientifici più ampi, l'obiettivo di questo lavoro è quello di fornire un piccolo contributo alla vivace ricerca scientifica attualmente attiva in questo ambito, andando ad avvalorare quanto già espresso in letteratura o andando a fornire nuovi spunti di riflessione provenienti peraltro da un'area d'Italia inesplorata finora in termini di frequenza mutazionale di questo gene.

Ciò che si auspica è, infatti, la possibilità di giungere ad una diagnosi precoce della malattia di Parkinson associata a mutazioni del gene GBA grazie ai numerosi lavori di caratterizzazione svolti. Poiché, inoltre, molti aspetti della patogenesi molecolare

e biologica di questa malattia sono ancora ignoti ed oggetto di numerosi studi e poiché un vivo interesse è dedicato in questa epoca scientifica alle possibilità terapeutiche connesse alla mutazione di questo gene, la speranza è che col tempo queste opzioni possano uscire dal campo della sperimentazione per affermarsi nella pratica clinica. Considerando, infatti, che un'alterazione molecolare a carico di GBA rappresenta il più frequente fattore di rischio genetico per lo sviluppo della malattia di Parkinson e che la diffusione delle sue mutazioni e dei suoi polimorfismi è molto ampia nella popolazione mondiale, nonché con la consapevolezza del fatto che alterazioni nell'attività della glucocerebrosidasi sembrano essere rilevate anche nelle forme idiopatiche di malattia<sup>24</sup>, è fondamentale che questo campo di ricerca si mantenga attivo e si intensifichi ulteriormente. Solo in questo modo la possibilità di raggiungere maggiori certezze in merito alla patogenesi della malattia di Parkinson e, soprattutto, di ampliare le attuali strategie terapeutiche introducendo farmaci diretti contro i meccanismi eziologici, diventeranno più concrete, portando a nuove prospettive nell'ambito della diagnosi, del trattamento e, soprattutto, della qualità di vita dei pazienti affetti.



## 7) BIBLIOGRAFIA

1. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *European Journal of Neurology*. 2020;27(1):27-42.
2. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2020;36(1):1-12.
3. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2020;323(6):548-560.
4. Braak H, Tredici K del, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. *Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease*. 2003;24:197-211.
5. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2019;39(1):31-59.
6. Brundin P, Melki R. Prying into the prion hypothesis for parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*. 2017;37(41):9808-9818.
7. Braak H, del Tredici K. Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. *Journal of Parkinson's Disease*. 2017;7(s1):S73-S87.
8. Klann EM, Dissanayake U, Gurralla A, et al. The Gut–Brain Axis and Its Relation to Parkinson's Disease: A Review. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;13.
9. Mirelman A, Bonato P, Camicioli R, et al. Gait impairments in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2019;18(7):697-708.
10. Postuma RB, Berg D, Stern M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2015;30(12):1591-1601.
11. Caproni S, Colosimo C. Diagnosis and Differential Diagnosis of Parkinson Disease. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2020;36(1):13-24.
12. Reich SG, Savitt JM. Parkinson's Disease. *Medical Clinics of North America*. 2019;103(2):337-350.
13. Uysal-Cantürk P, Hanağası HA, Bilgiç B, Gürvit H, Emre M. An assessment of Movement Disorder Society Task Force diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*. 2018;25(1):148-153.

14. Hoops S, Nazem BS, Siderowf BAD, et al. Validity of the MoCA and MMSE in the detection of MCI and dementia in Parkinson disease. *Neurology*. 2009;73(21):1738-1745.
15. Dubois B, Burn D, Goetz C, et al. Diagnostic procedures for Parkinson's disease dementia: Recommendations from the Movement Disorder Society Task Force. *Movement Disorders*. 2007;22(16):2314-2324.
16. Pfeiffer RF. Autonomic Dysfunction in Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics*. 2020;17(4):1464-1479.
17. Palma JA, Kaufmann H. Orthostatic Hypotension in Parkinson Disease. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2020;36(1):53-67.
18. Panicker N, Ge P, Dawson VL, Dawson TM. The cell biology of Parkinson's disease. *Journal of Cell Biology*. 2021;220(4).
19. Mehanna R, Jankovic J. Young-onset Parkinson's disease: Its unique features and their impact on quality of life. *Parkinsonism and Related Disorders*. 2019;65:39-48.
20. Balestrino R, Schapira AHV. Glucocerebrosidase and Parkinson Disease: Molecular, Clinical, and Therapeutic Implications. *Neuroscientist*. 2018;24(5):540-559.
21. Do J, McKinney C, Sharma P, Sidransky E. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2019;14(1).
22. Riboldi GM, di Fonzo AB. GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. *Cells*. 2019;8(4):364.
23. Blandini F, Cilia R, Cerri S, et al. Glucocerebrosidase mutations and synucleinopathies: Toward a model of precision medicine. *Movement Disorders*. 2019;34(1):9-21.
24. O'Regan G, Desouza RM, Balestrino R, Schapira AH. Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *Journal of Parkinson's Disease*. 2017;7(3):411-422.
25. Balestrino R, Tunesi S, Tesi S, Lopiano L, Zecchinelli AL, Goldwurm S. Penetrance of Glucocerebrosidase (GBA) Mutations in Parkinson's Disease: A Kin Cohort Study. *Movement Disorders*. 2020;35(11):2111-2114.
26. Petrucci S, Ginevrino M, Trezzi I, et al. GBA-Related Parkinson's Disease: Dissection of Genotype-Phenotype Correlates in a Large Italian Cohort. *Movement Disorders*. 2020;35(11):2106-2111.
27. Migdalska-Richards A, Schapira AHV. The relationship between glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease. *Journal of Neurochemistry*. Published online October 1, 2016:77-90.

28. Toffoli M, Smith L, Schapira AHV. The biochemical basis of interactions between Glucocerebrosidase and alpha-synuclein in GBA1 mutation carriers. *Journal of Neurochemistry*. 2020;154(1):11-24.
29. Gan-Or Z, Liong C, Alcalay RN. GBA-Associated Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2017;18(8).
30. Huh YE, Chiang MSR, Locascio JJ, et al.  $\beta$ -Glucocerebrosidase activity in GBA-linked Parkinson disease: The type of mutation matters. *Neurology*. 2020;95(6):e685-e696.
31. Behl T, Kaur G, Fratila O, et al. Cross-talks among GBA mutations, glucocerebrosidase, and  $\alpha$ -synuclein in GBA-associated Parkinson's disease and their targeted therapeutic approaches: a comprehensive review. *Translational Neurodegeneration*. 2021;10(1).
32. Henderson MX, Sedor S, McGeary I, et al. Glucocerebrosidase Activity Modulates Neuronal Susceptibility to Pathological  $\alpha$ -Synuclein Insult. *Neuron*. 2020;105(5):822-836.
33. Thaler A, Gurevich T, Bar Shira A, et al. A "dose" effect of mutations in the GBA gene on Parkinson's disease phenotype. *Parkinsonism and Related Disorders*. 2017;36:47-51.
34. Mata IF, Leverenz JB, Weintraub D, et al. GBA Variants are associated with a distinct pattern of cognitive deficits in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2016;31(1):95-102.
35. Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, et al. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology*. 2015;84:880-887.
36. Filippi M, Balestrino R, Basaia S, Agosta F. Neuroimaging in Glucocerebrosidase-Associated Parkinsonism: A Systematic Review. *Movement Disorders*. Published online May 6, 2022.
37. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2018;122(1).
38. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-generation sequencing technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2019;9(11).
39. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, et al. Movement Disorder Society-Sponsored Revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale presentation and clinimetric testing results. *Movement Disorders*. 2008;23(15):2129-2170.
40. Goetz CG, Poewe W, Rascol O, et al. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: Status and recommendations. *Movement Disorders*. 2004;19(9):1020-1028.

41. Sletten DM, Suarez GA, Low PA, Mandrekar J, Singer W. COMPASS 31: A refined and abbreviated composite autonomic symptom score. *Mayo Clinic Proceedings*. 2012;87(12):1196-1201.
42. Brockmann K, Srulijes K, Pflederer S, et al. GBA-associated Parkinson's disease: Reduced survival and more rapid progression in a prospective longitudinal study. *Movement Disorders*. 2015;30(3):407-411.
43. Post B, van den Heuvel L, van Prooije T, van Ruissen X, van de Warrenburg B, Nonnekes J. Young Onset Parkinson's Disease: A Modern and Tailored Approach. *Journal of Parkinson's Disease*. 2020;10(s1):S29-S36.
44. Cilia R, Tunesi S, Marotta G, et al. Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: The mutation matters. *Annals of Neurology*. 2016;80(5):662-673.