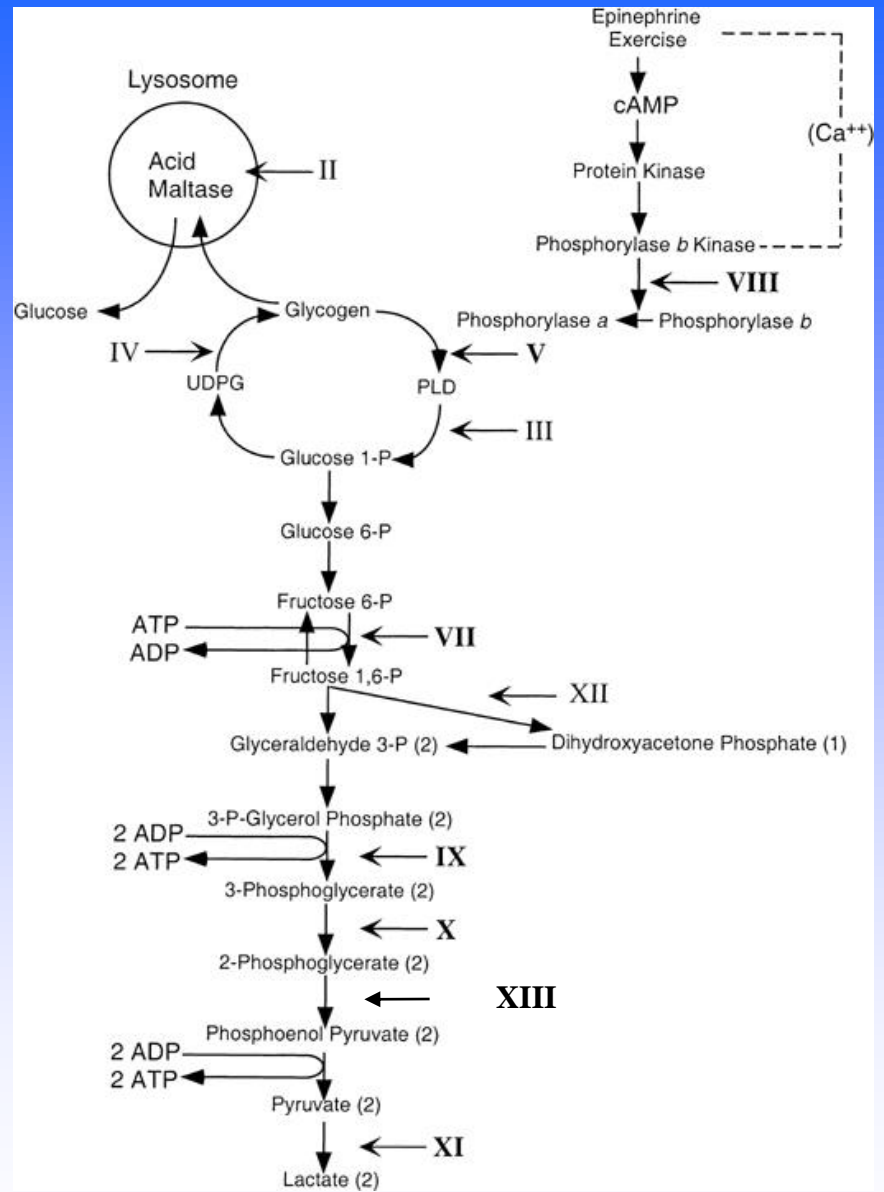


Clinica della Glicogenosi di tipo III

Giacomo P. Comi

Centro Dino Ferrari,
Università degli Studi di Milano,
Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico,
Mangiagalli e Regina Elena,
Milano, Italy

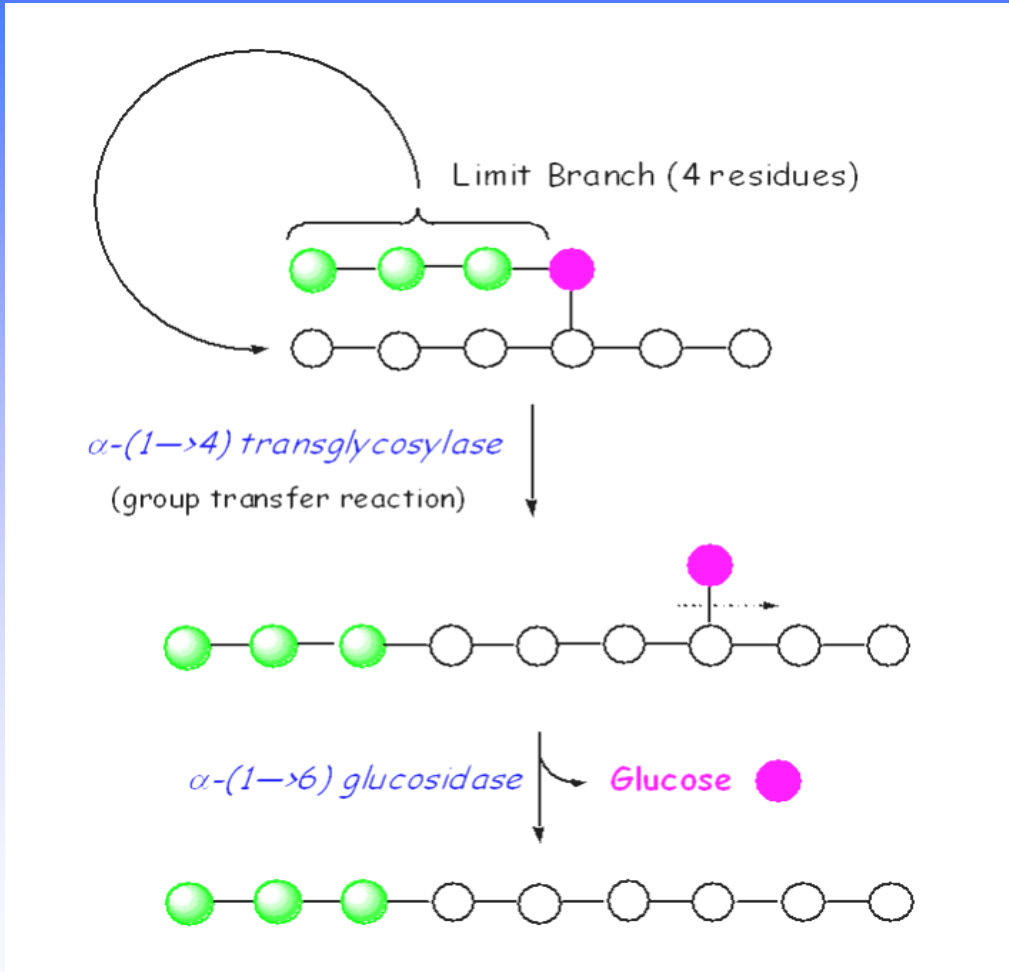
- II Acid maltase
- III Debrancher
- IV Brancher
- V Phosphorylase
- VII PFK-M
- VIII Phosphorylase b kinase
- IX Phosphoglyceratek.
- X M- Phosphoglycerate mutase
- XI Muscle LDH
- XII Aldolase A
- XIII β -Enolase



Glycogen Storage Disease Type III

- **1928-1932: van Creveld** observed two patients with hepatomegaly and failure to mobilize liver glycogen
- **1952: Illingworth B, Cori GT**: Structure of abnormal glycogen. J Biol Chem 199:653, 1952.
- **1953: Forbes** describes an infantile case with abnormal glycogen structure in liver and skeletal muscle. J Pediatr 42: 645, 1953.
- **1956: Illingworth B, Cori GT, Cori CF**. Determination of AGL systemic deficiency
- **1992**: Cloning of AGL cDNA. **Yang** et al. J Biol Chem.267:9294, 1992.
- **1997**: First AGL gene mutation. **Shen** et al. Hum Mut. 9:37, 1997.

Amylo-1,6-glycosylase, 4- α -glucantransferase activities

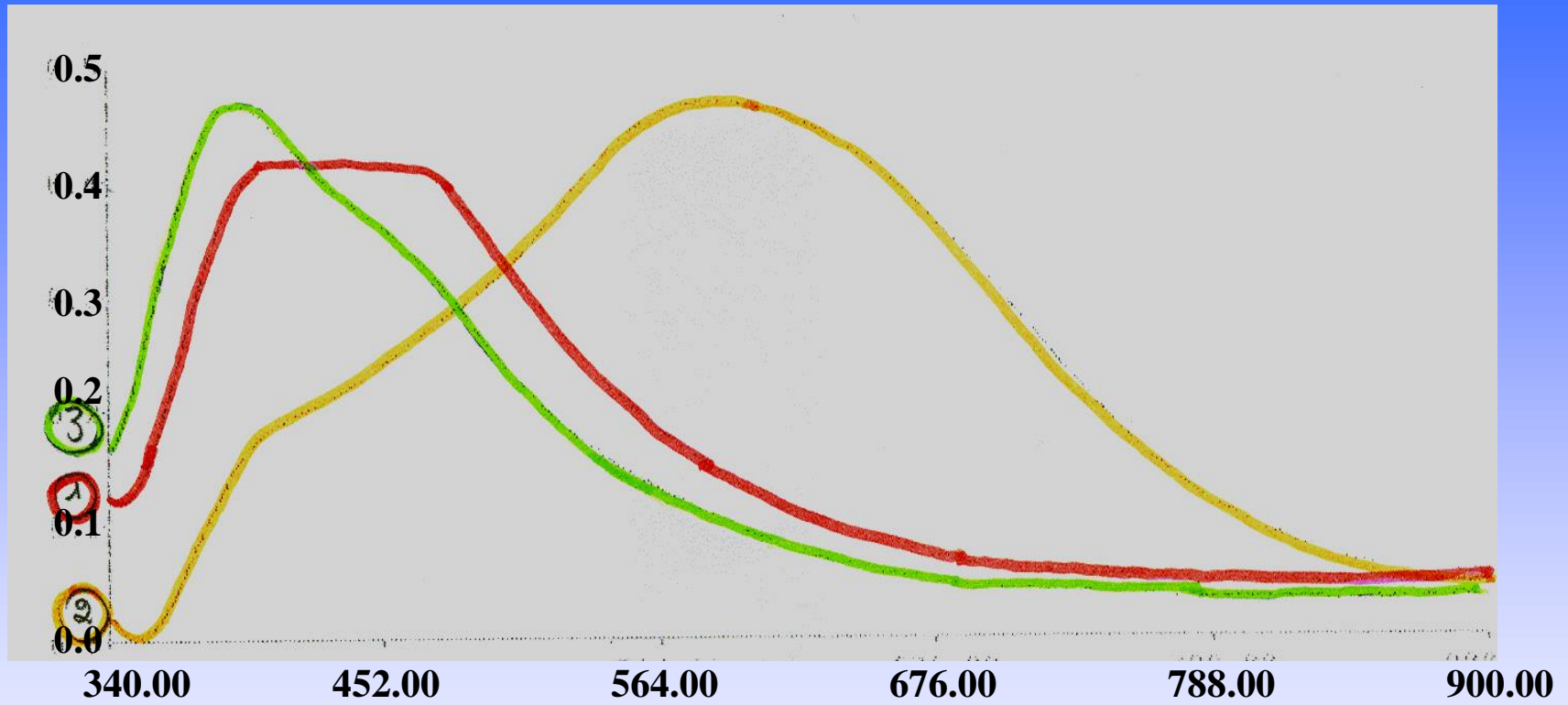


1. **Reverse reaction: rate of incorporation of ^{14}C -Glucose into glycogen**

2. **Glucose liberation from Phosphorylase Limit Destrin**

**Hers, Verhue,
VanHoof, Eur J
Biochem 2:257, 1967**

Spettro di assorbimento del glicogeno



1. Spettro di assorbimento del glicogeno normale
2. Spettro di assorbimento del glicogeno in pz con GSD IV
3. Spettro di assorbimento del glicogeno in pz con GSD III

Glicogenosi di tipo III

Malattia autosomica recessiva causata dal deficit dell'enzima deramificante del glicogeno (amylo-1,6-glucosydase, 4- α -glucantransferase, AGL).

Gene *AGL*: -Cromosoma 1p21 85 kb
 -35 esoni, 7.0 kb mRNA, cdr 4596 bp

Proteina: -1532 aminoacidi
 -MW 165 kDa

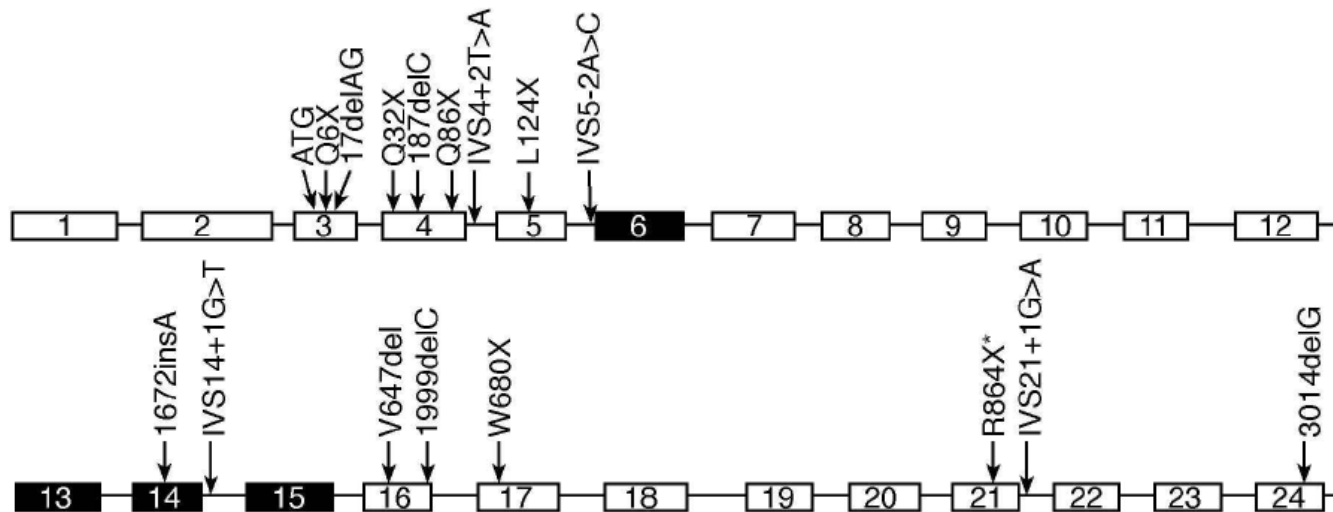
Isoforme tessuto-specifiche di mRNA

6 isoforme di mRNA di AGL sono state identificate da fegato e muscolo, differenti solo nella porzione 5' terminale.

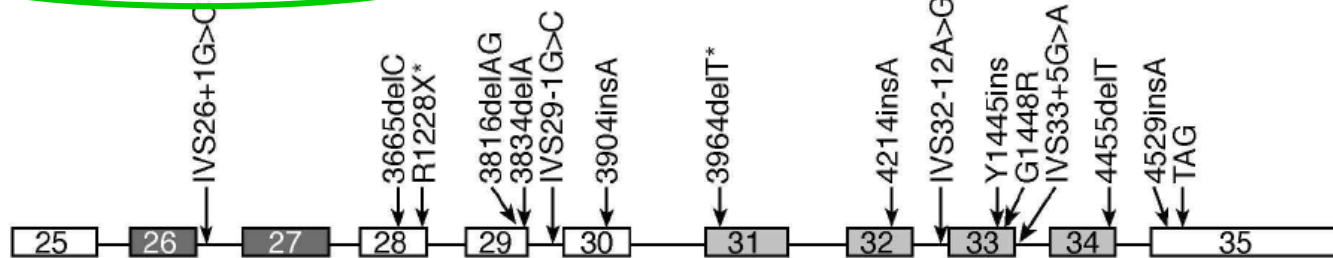
Isoforma 1: forma predominante espressa sia nel fegato sia nel muscolo.

Isoforme 2, 3 e 4, muscolo-specifiche: espresse nel muscolo e nel cuore.

Isoforme 5 e 6, presenti nel muscolo e nel cuore in piccole quantità.



Putative transferase catalytic residues



Putative glycogen binding domain

Putative glucosidase catalytic residues

D102
D163

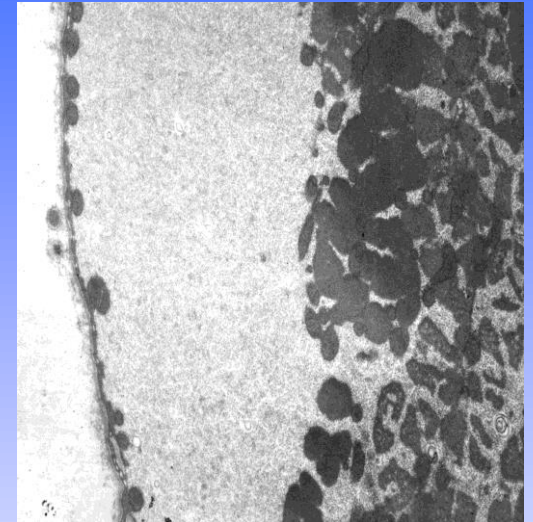
I pazienti con deficit di enzima deramificante sono classificati in 4 gruppi:

1. Tipo IIIa: caratterizzato da mancanza dell'attività trasferasica e glucosidasica sia nel muscolo che nel fegato (80% dei casi).
2. Tipo IIIb: anche esso caratterizzato da mancanza dell'attività trasferasica e glucosidasica, ma il muscolo e il cuore sono risparmiati (15% dei casi).
3. Tipo IIIc: caratterizzato dalla perdita selettiva dell'attività glucosidasica.
4. Tipo III d: include pazienti con perdita selettiva dell'attività trasferasica nel muscolo e nel fegato.

Caratteristiche cliniche della GSD tipo III

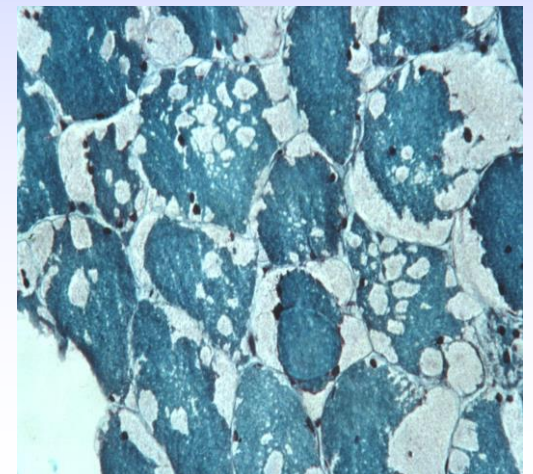
- **Possibili sintomi nell'infanzia**

- Ipoglicemia ricorrente a digiuno
- Epatomegalia e aumento transaminasi sieriche
- Ipotono
- Crisi comiziali in corso di ipoglicemia
- Ritardo di crescita

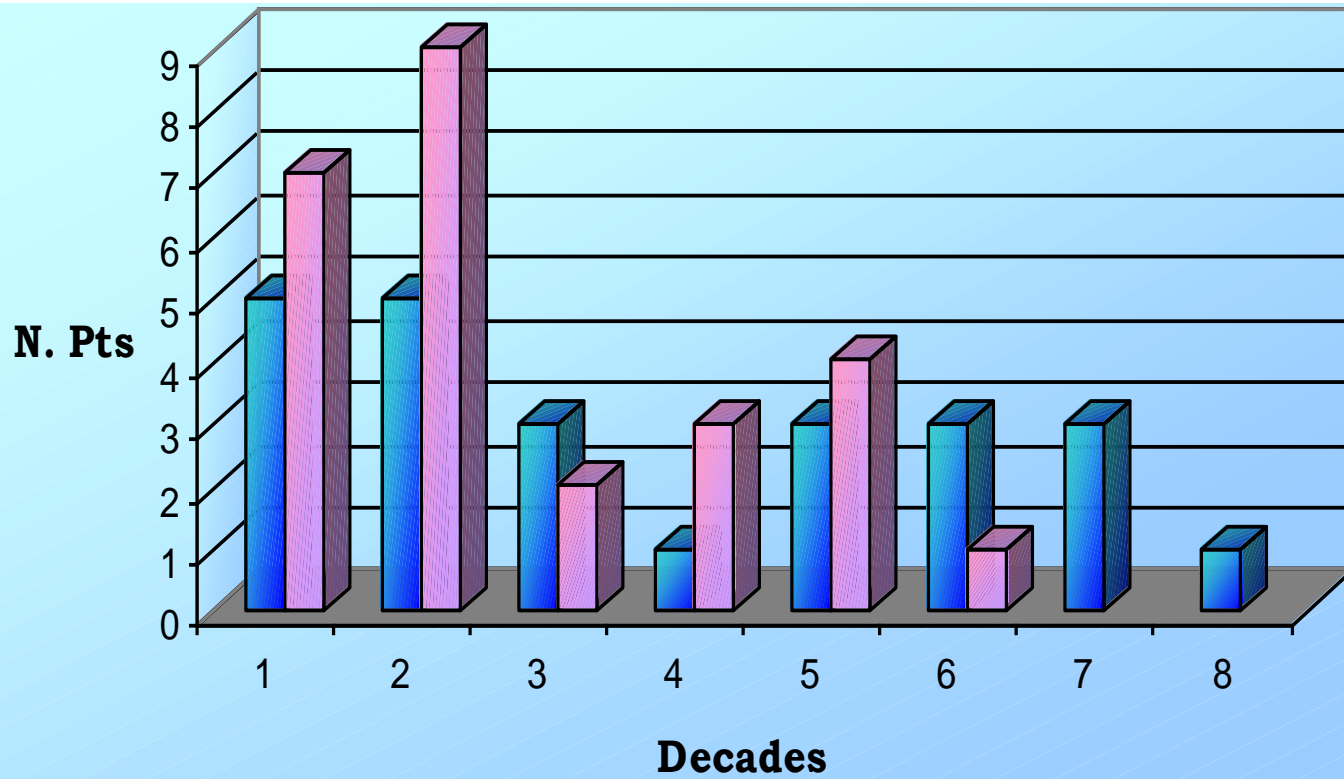


- **Manifestazioni cliniche nell'adulto**

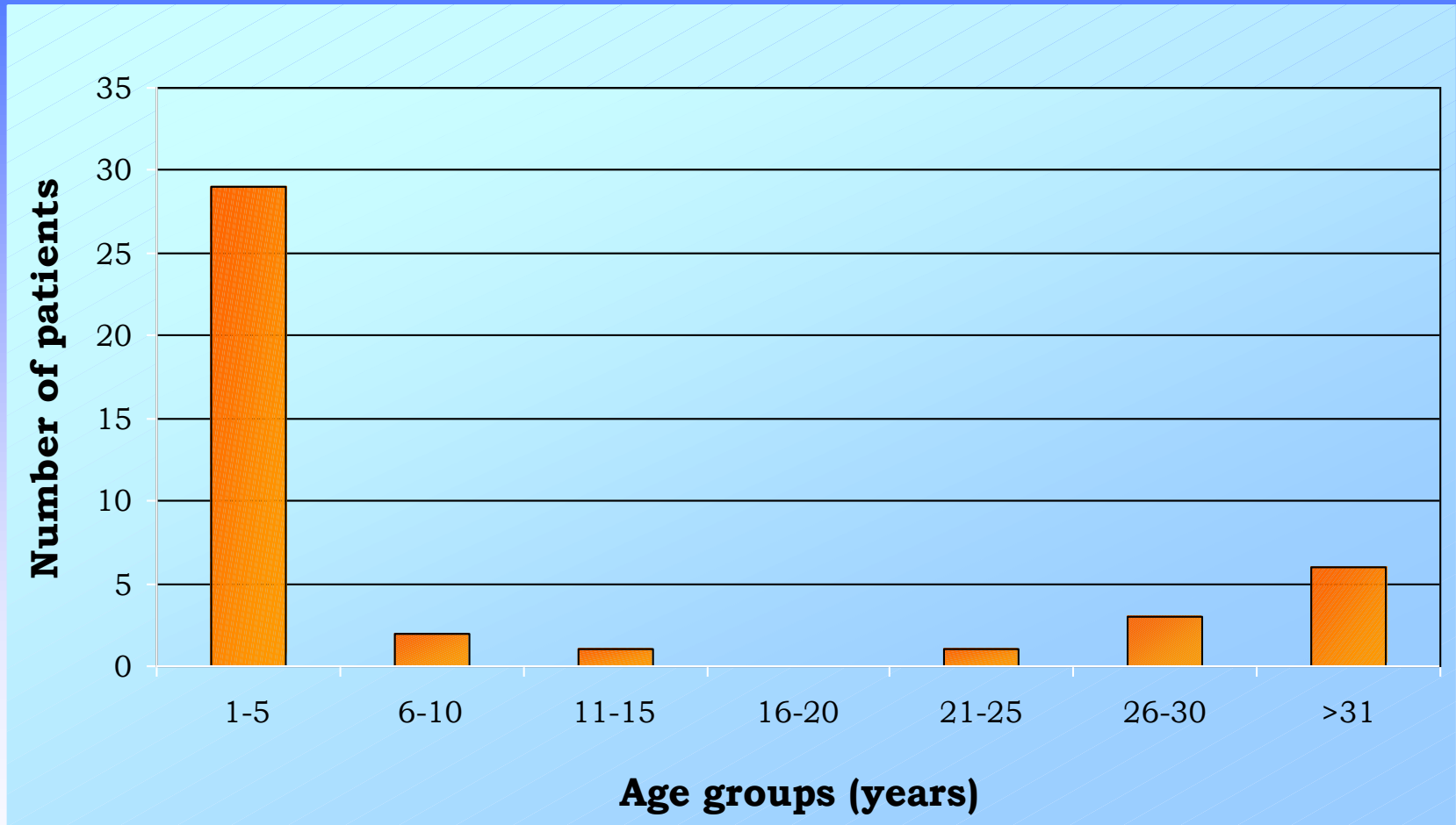
- Ipostenia prevalentemente distale (es.gastrocnemi e muscoli peroneali)
- Grado variabile di ipostenia prossimale
- Affaticabilità
- Progressione lenta
- Valori di CK sierici aumentati da 5x a 45x
- Segni di neuropatia
- Disfunzione epatica e cardiomiopatia



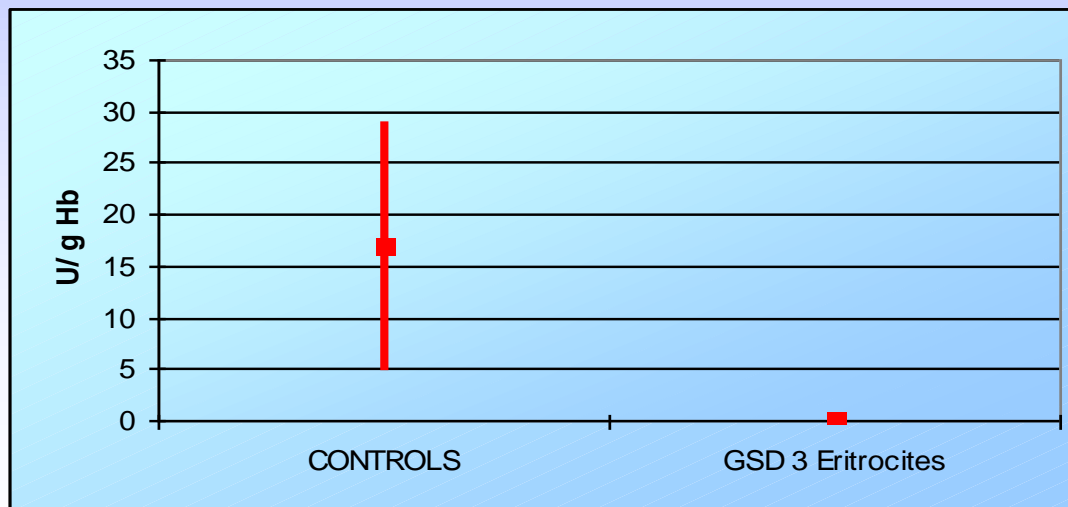
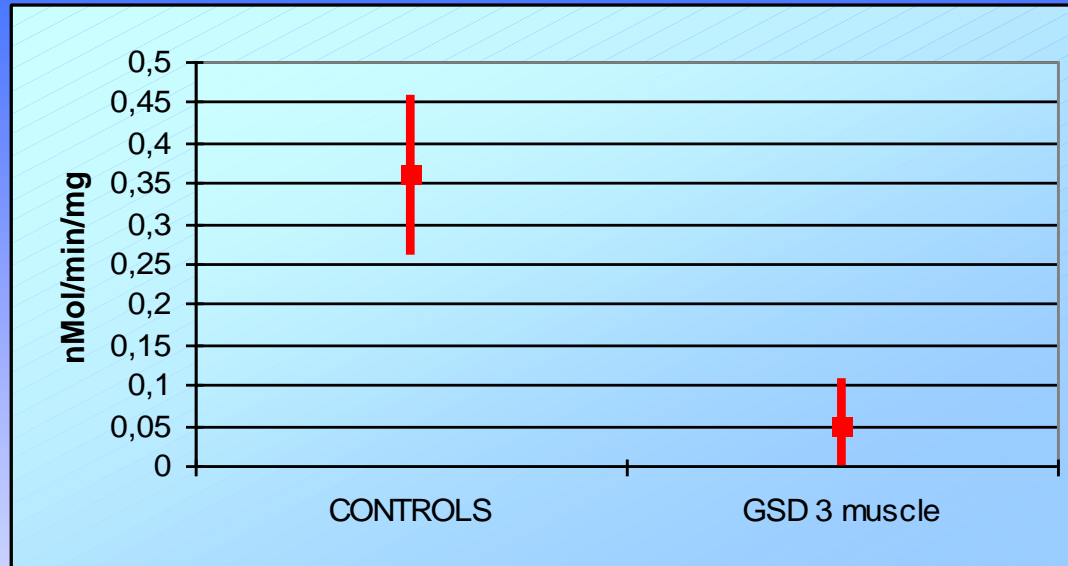
Pazienti GSDIII : Maschi 26
Femmine 25



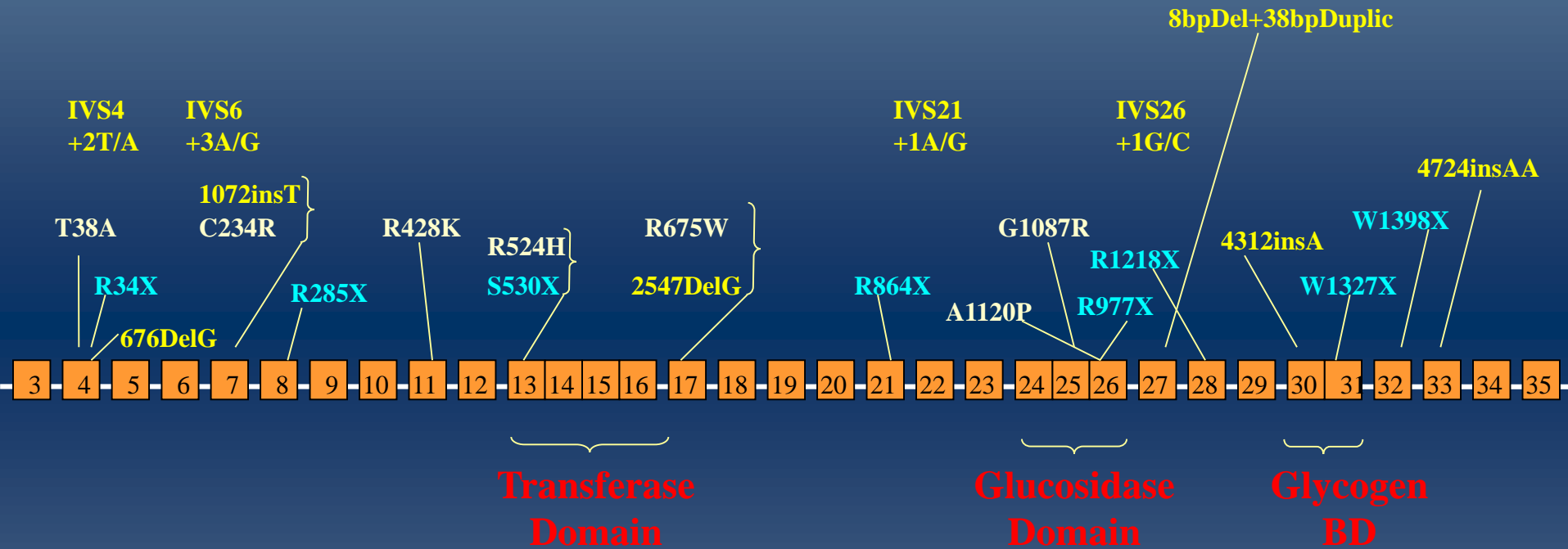
Età alla diagnosi



Attività enzimatica residua di AGL nel muscolo e nei globuli rossi

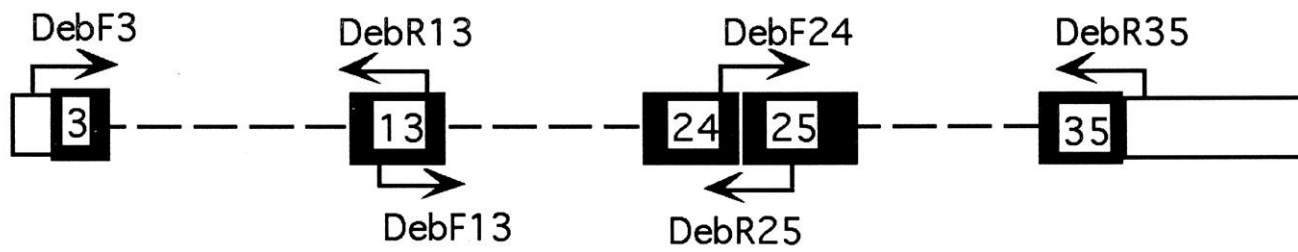


Mutazioni del gene *AGL*

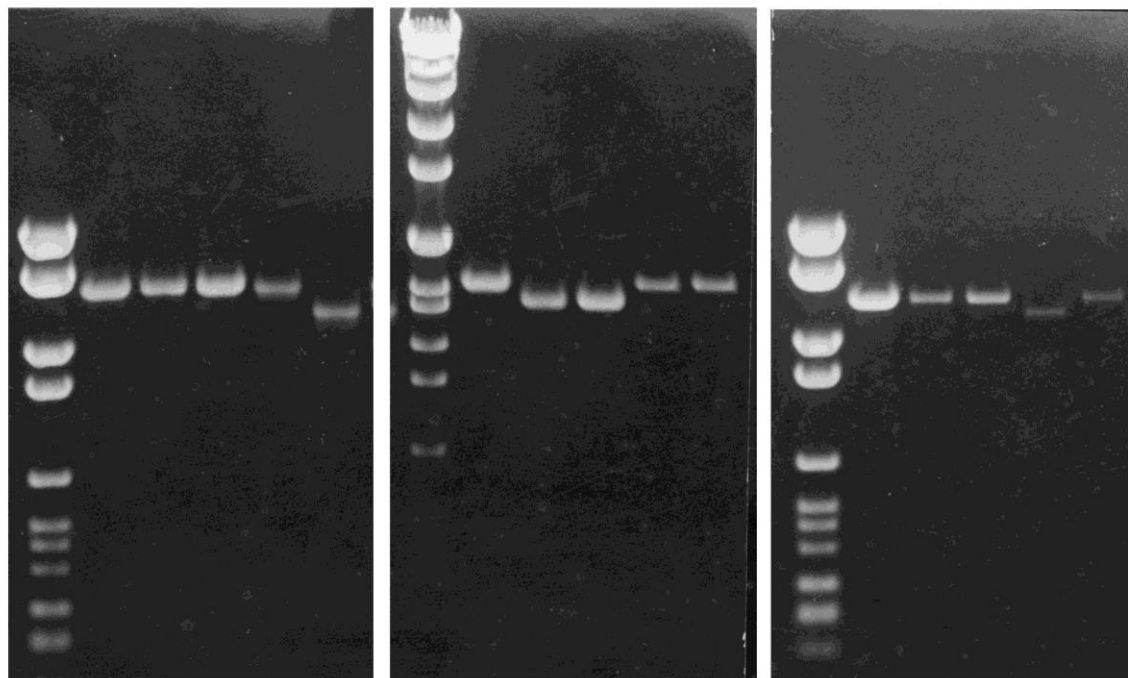
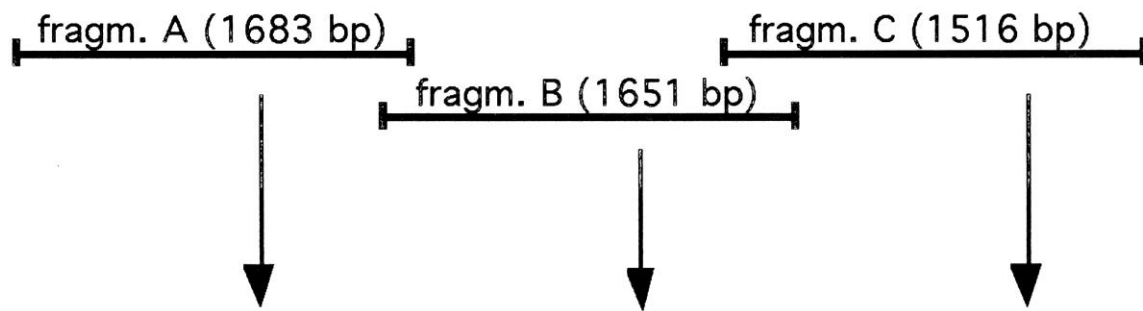


Mutation Type		% on Characterized Alleles
Exon Skipping		40.3
	IVS21+1 A/G In Frame	23.4
	IVS6+3 A/G In Frame	11.7
	IVS4+2 T/A Out of Frame	pm
	IVS26+1 G/C Out of Frame	pm
Stop		23.4
	R1218X	5.2
	T1398X	pm
	R34X	pm
	R864X	pm
	W1327X	pm
	S530X	pm
	R977X	pm
	R285X	pm
	R910X	pm
	K422X	pm
Missense		15.6
	R675W	pm
	C234R	pm
	R428K	pm
	T38A	pm
	R524H	pm
	A1120P	pm
	G1087R	pm
	A253P	pm
Microdeletions		10.4
	676DelG	2.6
	2547DelG	pm
	442DelA	pm
	8bpDel	pm
	753-6DelGACA	pm
	3963DelG	pm
Microinsertions		10.4
	1072insT	pm
	4724insAA	pm
	4312insA	pm
Macroinsertion		1.3
	38bpDup	pm

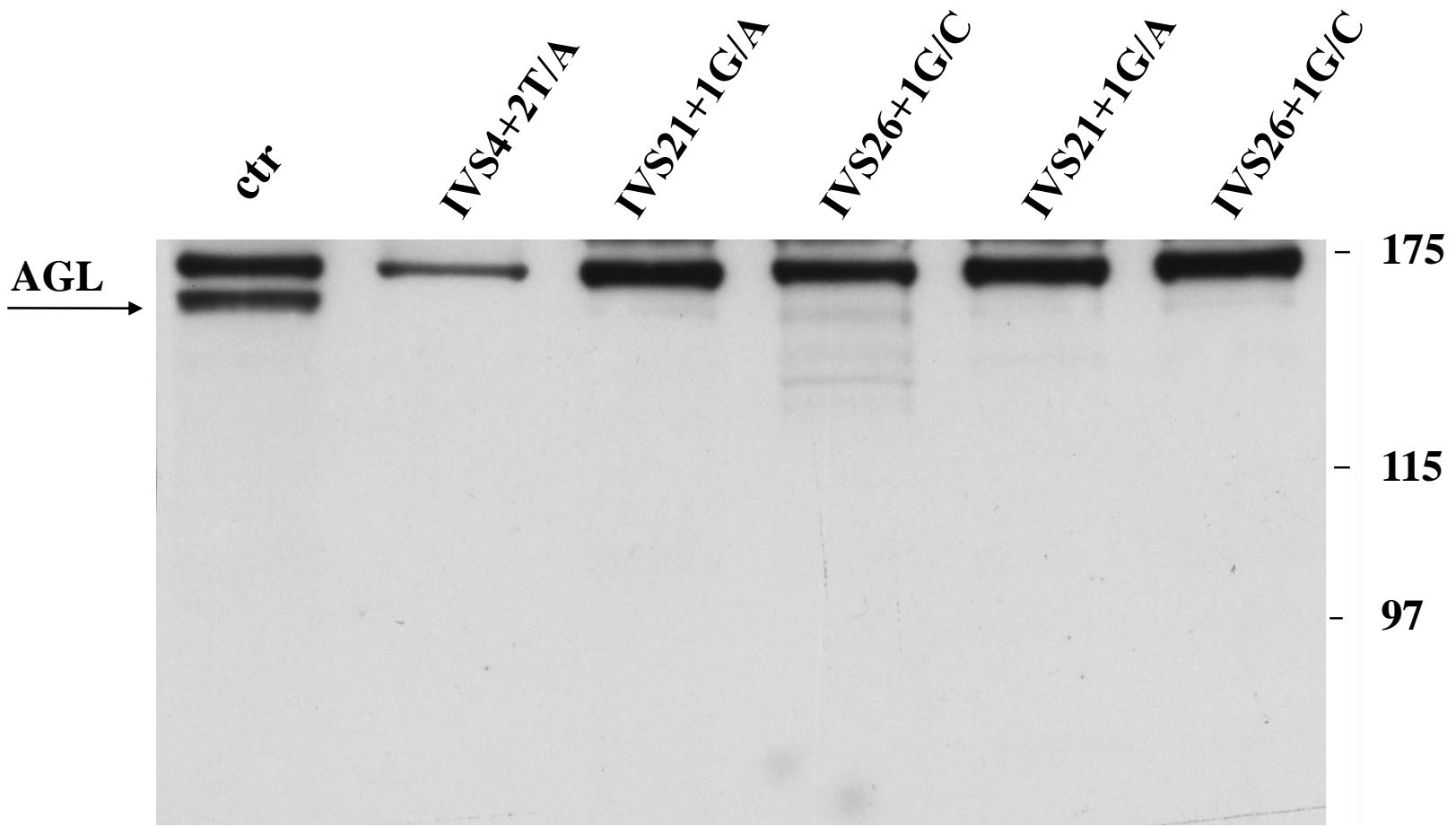
Mutation	Effects	GSD Type	N° Pts	Geographic Origin	Author
17 delAG	frameshift	IIIb	10	Caucasian	Shen, 1996. J Clin Invest
Q6X	stop	IIIb	1	Caucasian	"
W680X	stop	IIIa	1	Caucasian	"
R864X	stop	IIIa	1	Caucasian	"
R1228X	stop	IIIa	1	Caucasian	"
4529 insA	frameshift	IIIa	1	?	Shen, 1996. Hum Mut
IVS32 -12 A/G	exon-skip	IIIa	1	Japanese	Okubo, 1998. Hum Gen
"			1	Caucasian	Shaiu, 2000. Mol Gen Metab
G1448R	missense	IIIa	1	Japanese	Okubo, 1999. Hum Mut
2399 delC	frameshift	IIIb ?	1	Japanese	Okubo, 2000. Am J Med Gen
IVS33 +5 G/A	exon-skip	IIIb ?	1	Chinese	"
IVS14 +1 G/C	exon-skip	IIIa	1	Japanese	Okubo, 2000. Hum Gen
L124X	stop	IIIa	2	Japanese	"
IVS29 -1 G/C	exon-skip	IIIa	2	Japanese	"
587 delC	frameshift	IIIa	1	Japanese	"
4216 del AG	frameshift	IIIa	2	Japanese	"
2072 insA	frameshift	IIIa	1	Japanese	"
4735 insTAT	frameshift	IIIa	2	Japanese	"
2725_19delTCAG	frameshift	IIIa	2	Hong Kong Chinese	Lam, 2004. Mol Genet Metab
R408X	stop	IIIa	1	Chinese	"
R408X	stop	IIIa	6	Faroe Islands	Santer, 2001. Eur J Hum Genet
4455 delT	frameshift	IIIa	12	North African Jewish	Parvari, 1997. Eur J Hum Gen
Biochem Diagn			3	Inuit	Zimakas, 2005. Canad Med Ass J
3904 insA	frameshift	IIIa	1	Ashkenazi Jewish	Parvari, 1998. J Inh Met Dis
4214 insA	frameshift	IIIa	1	Ashkenazi Jewish	"
3964 delT	frameshift	IIIa	1	African American	Shaiu, 2000. Mol Gen Metab
Q32X	stop	IIIa	?	?	Shaiu, 2000. Mol Gen Metab
Q86X	stop	IIIa	?	?	"
3014 delG	frameshift	IIIa	?	?	"
3665 delC	frameshift	IIIa	?	?	"
V647del	frameshift	IIIa	?	?	"



EXPECTED RT-PCR PRODUCTS

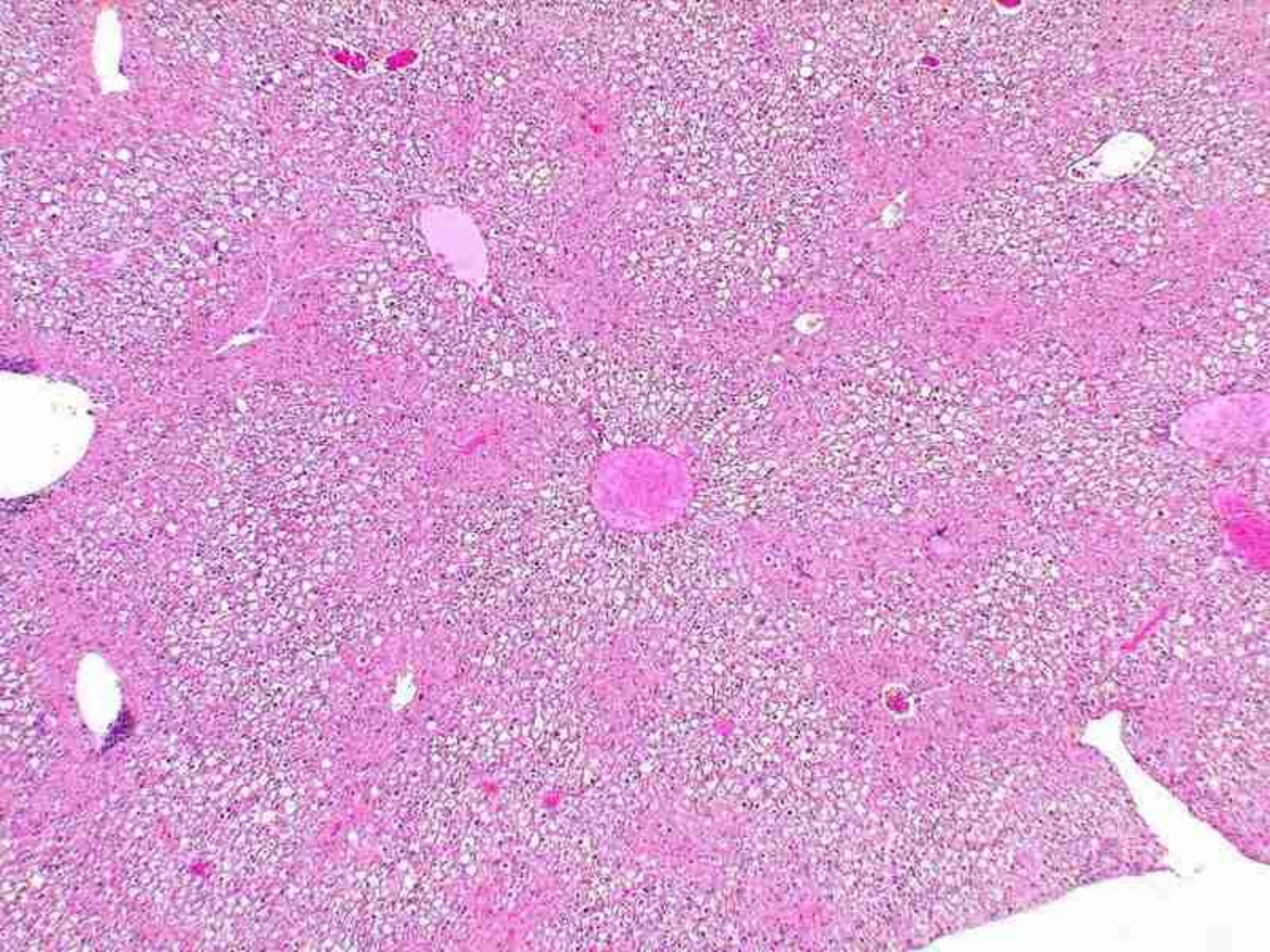


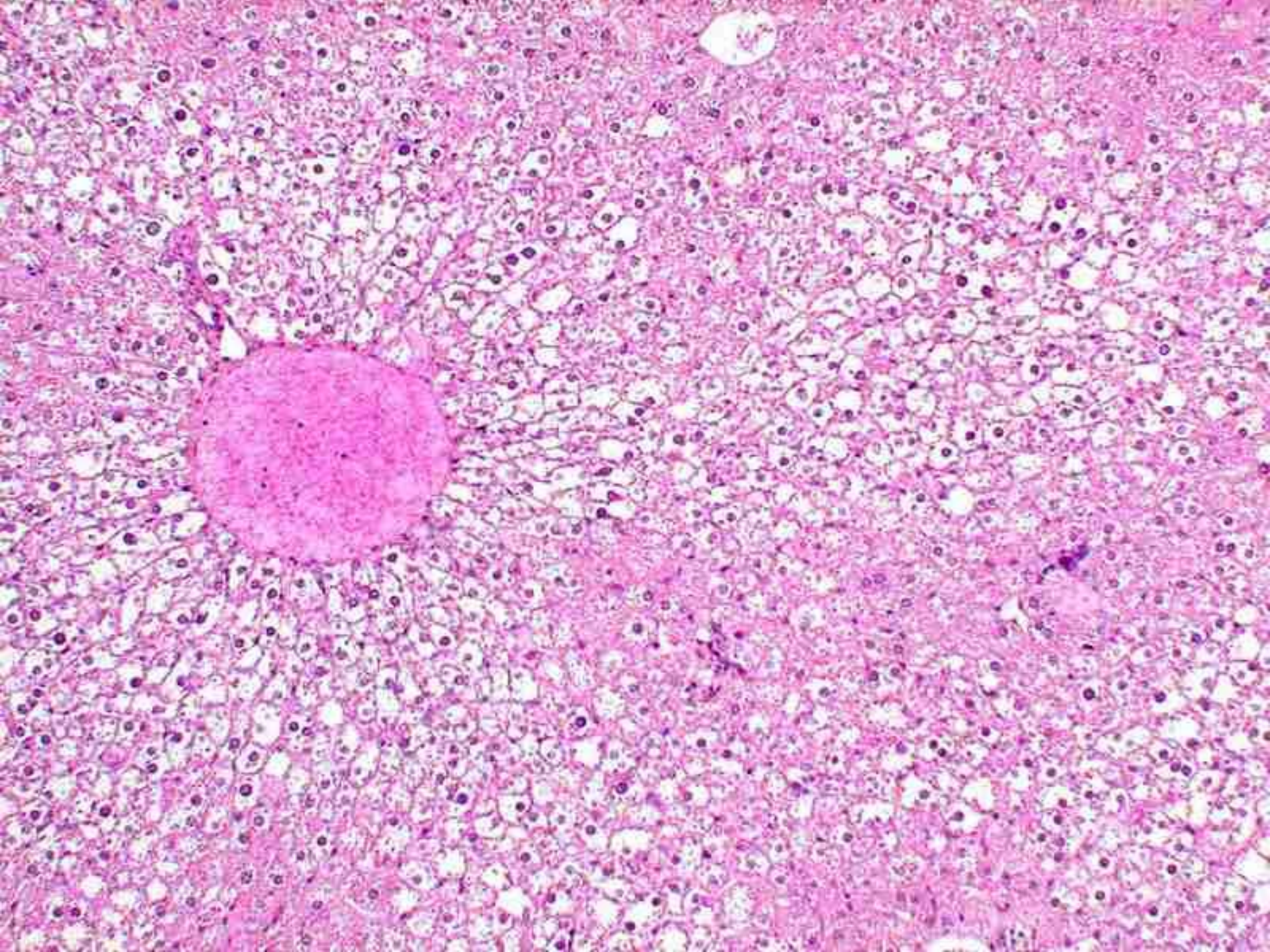
m 1 2 3 4 5 m 1 2 3 4 5 m 1 2 3 4 5

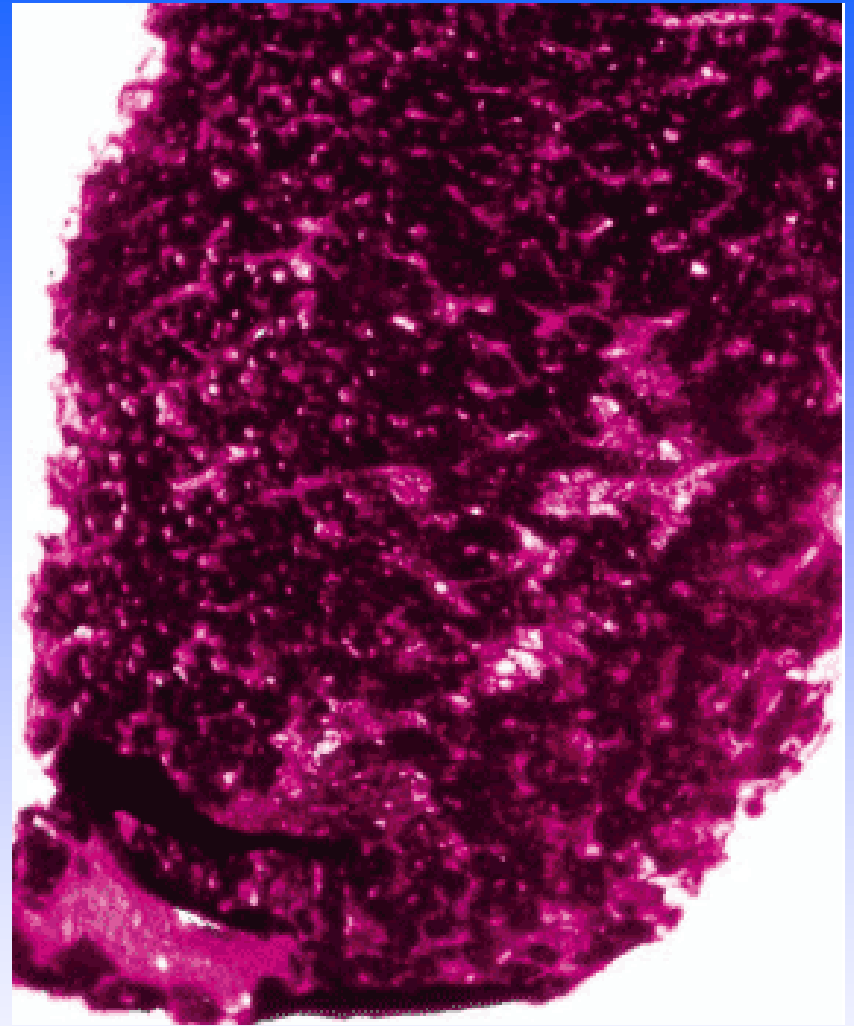
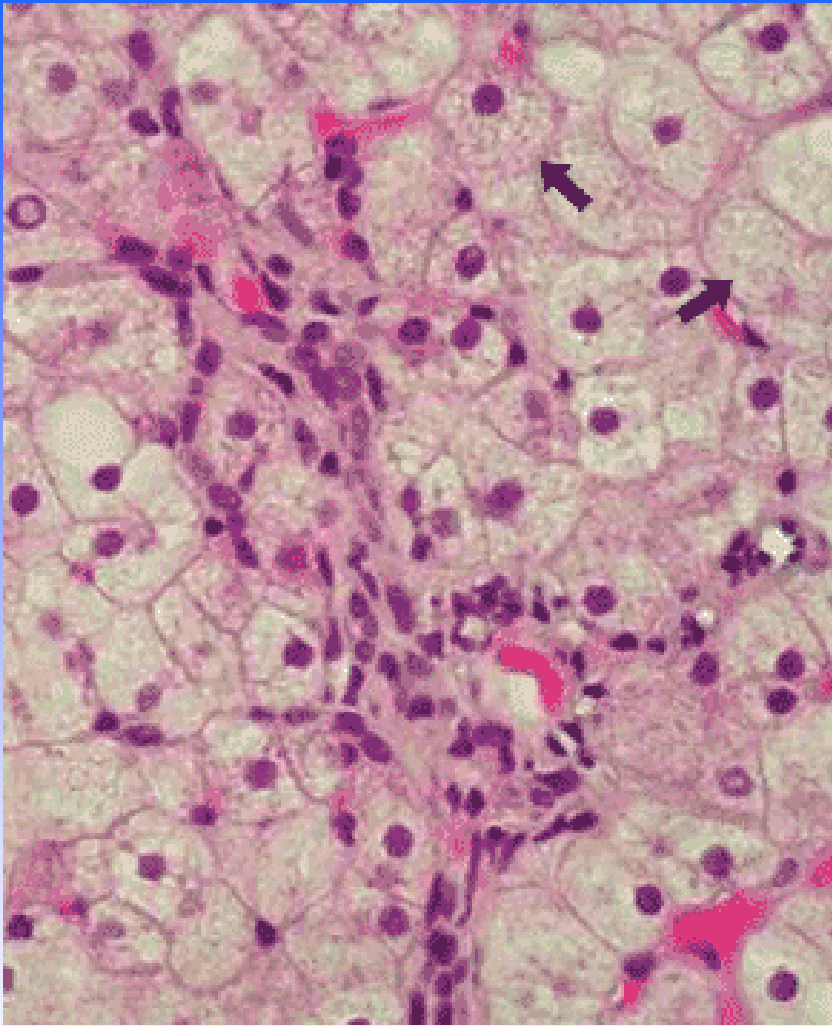


L'INTERESSAMENTO EPATICO

- Valori di AST e ALT utilizzati per monitorare nel tempo il danno degli epatociti dovuto all'accumulo di glicogeno.
- Il coinvolgimento epatico si presenta solitamente nell'infanzia.
- Solitamente i sintomi regrediscono nell'età adulta.
- Correlazione inversa tra valori di transaminasi ed età.
- Ecografia epatica: screening di base per identificare segni di involuzione epatica
- Rari casi di Epatocarcinoma in pazienti adulti con cirrosi (6 casi descritti tutti di età > 30 anni), nessuno nella nostra casistica, ma due pazienti sottoposti a trapianto di fegato a 30 e 32 anni rispettivamente.

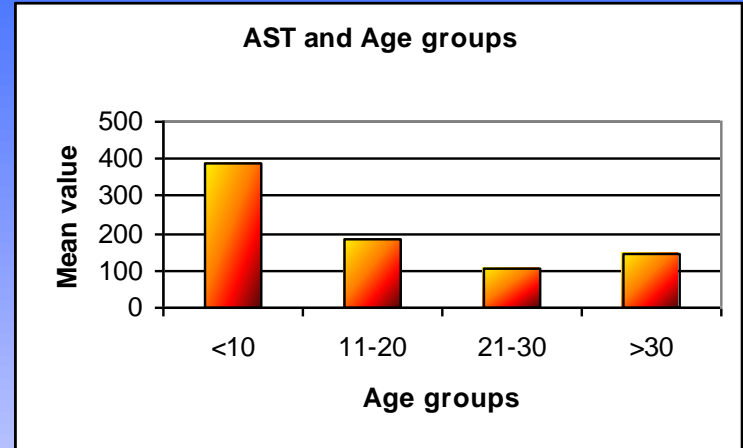




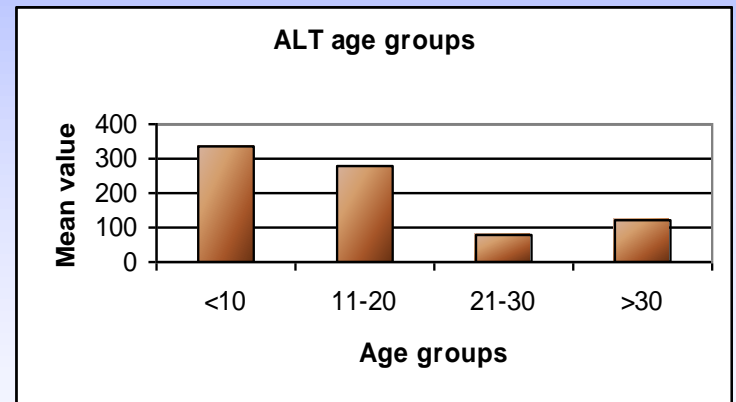


Le cellule epatiche mostrano un citoplasma pallido e microvacuolato, senza ulteriore danno dell'epatocita (Fig.1, ematossilina eosina, x200). Tali depositi sono PAS positivi (Fig.2), indicando la presenza di depositi di glicogeno ed escludendo una steatosi.

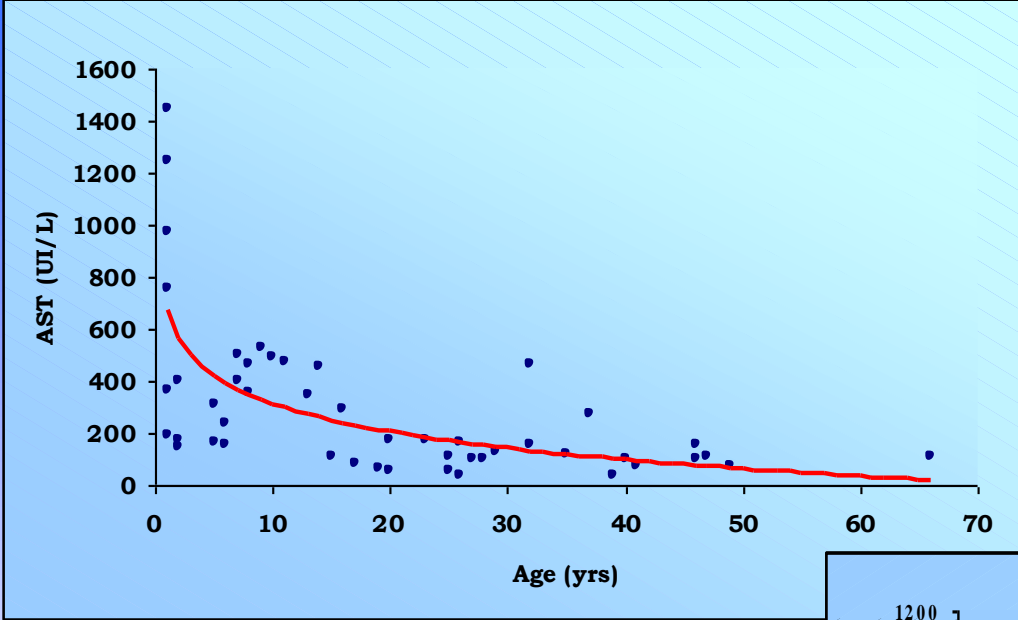
Classi di età	<10	11-20	21-30	>30
Media U/L	387	182	107	147



Classi di età	<10	11-20	21-30	>30
Media U/L	337	278	81	123

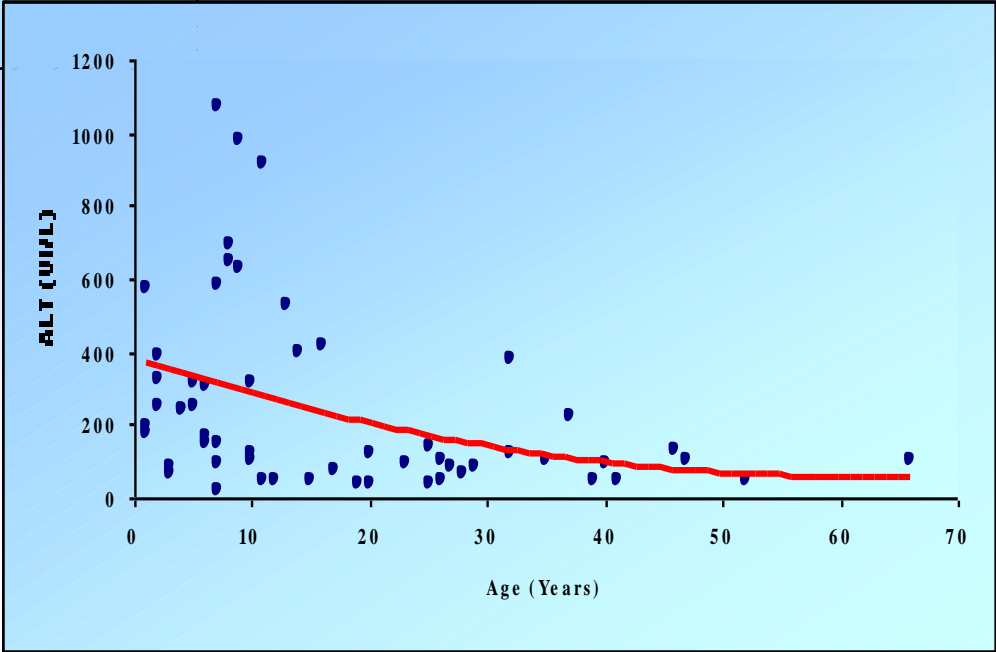


CORRELAZIONE TRA L'ETA' E I VALORI DI TRANSAMINASI

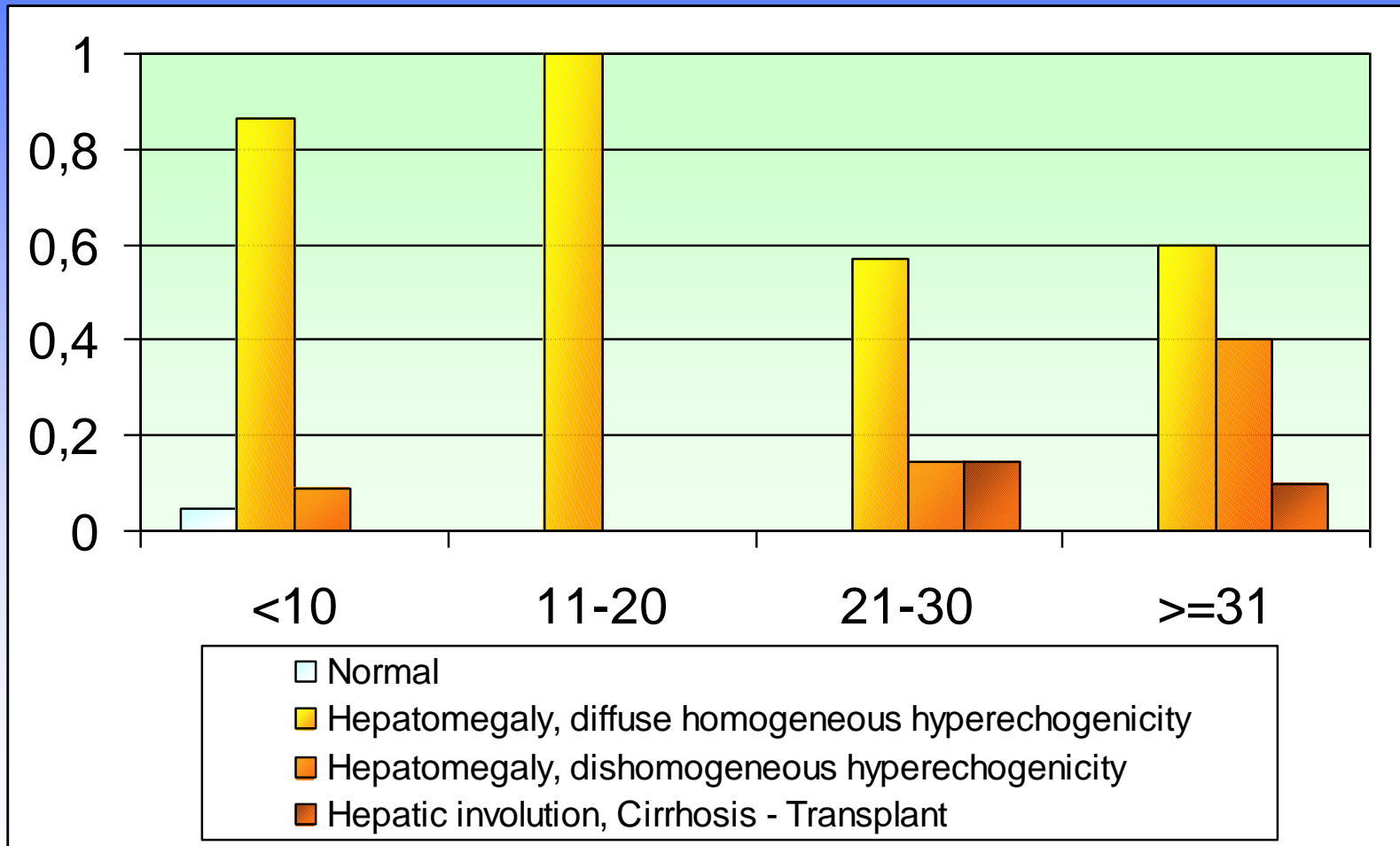


AST

ALT



REPERTI ECOGRAFICI NEL FEGATO



Gravità	<10 anni	11-20 anni	21-30 anni	>=31 anni
Normale	4,5%	0	0	0
+	86%	100%	66.6%	55%
++	9%	0	16%	36%
+++	0	0	16%	9%

Due pazienti hanno sviluppato insufficienza epatica con successivo trapianto di fegato a 30 e 32 anni rispettivamente.

Glycogen storage disease type III-hepatocellular carcinoma a long-term complication?

J Hepatol. 2007 Mar;46(3):492-8. Epub 2006 Nov 9 Erin Demo, et al

- 2 casi di HCC in una coorte di 45 pazienti con età variabile dai 2 ai 67 anni. Uno diagnosticato a 54 anni e uno a 67.
- 2 casi di adenoma epatico riscontrati dopo i 35 anni.
- Monitoraggio frequente di Transaminasi, AFP, CEA, Ecografia epatica ed eventuale TAC o RMN addome nei casi a rischio.

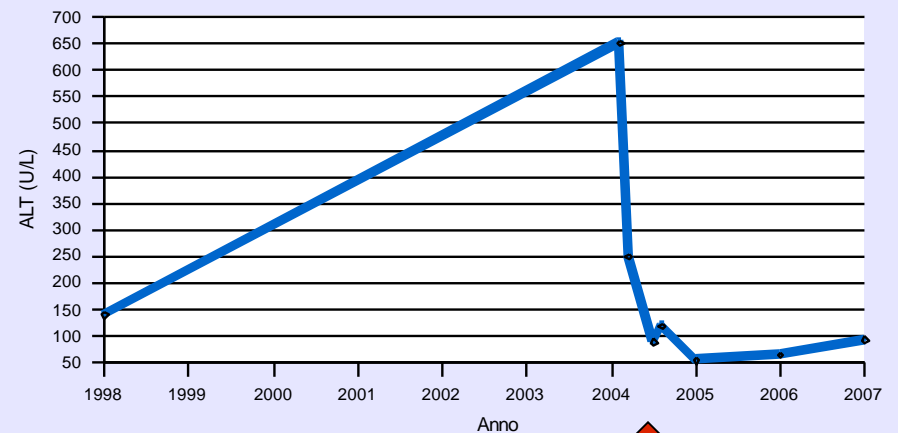
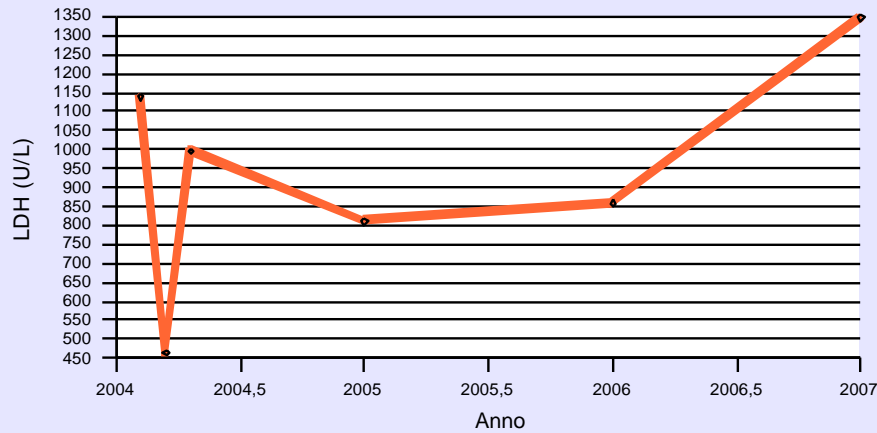
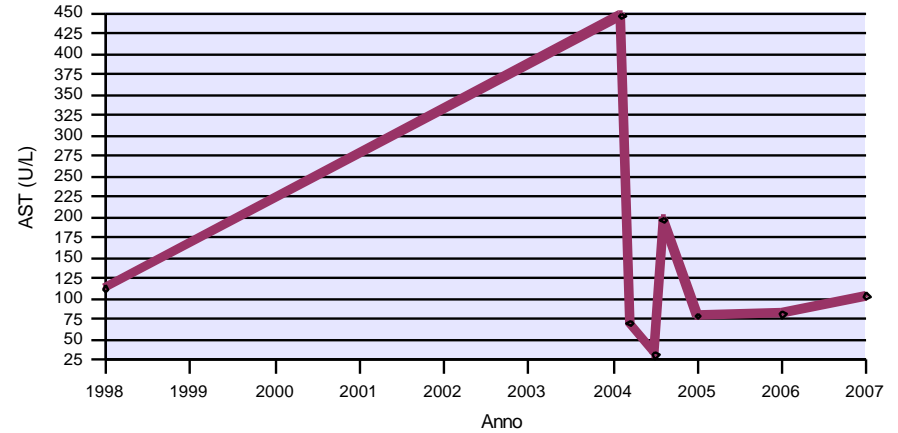
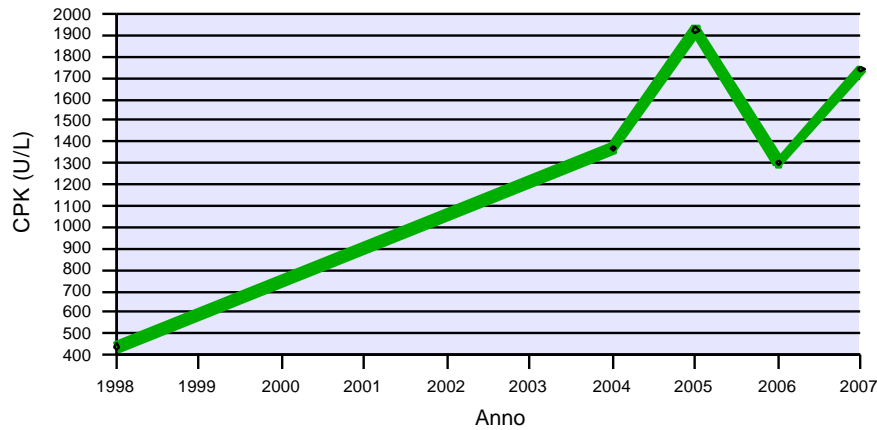
Type IIIb glycogen storage disease associated with end-stage cirrhosis and hepatocellular carcinoma

Hepatology. 1997 Mar;25(3):537-40 E B Haagsma, et al

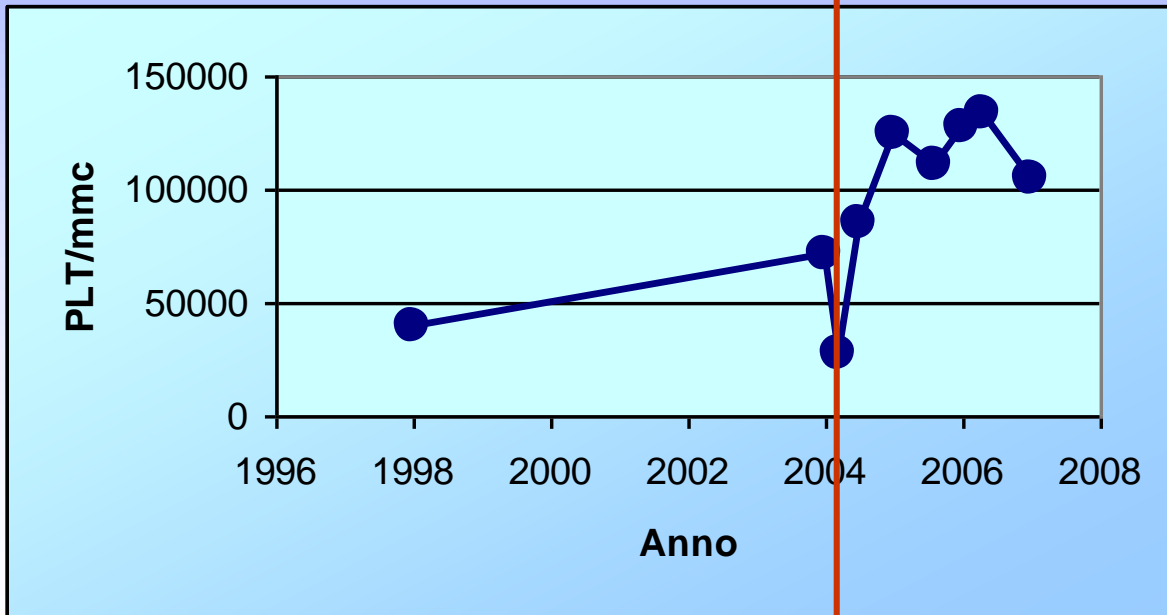
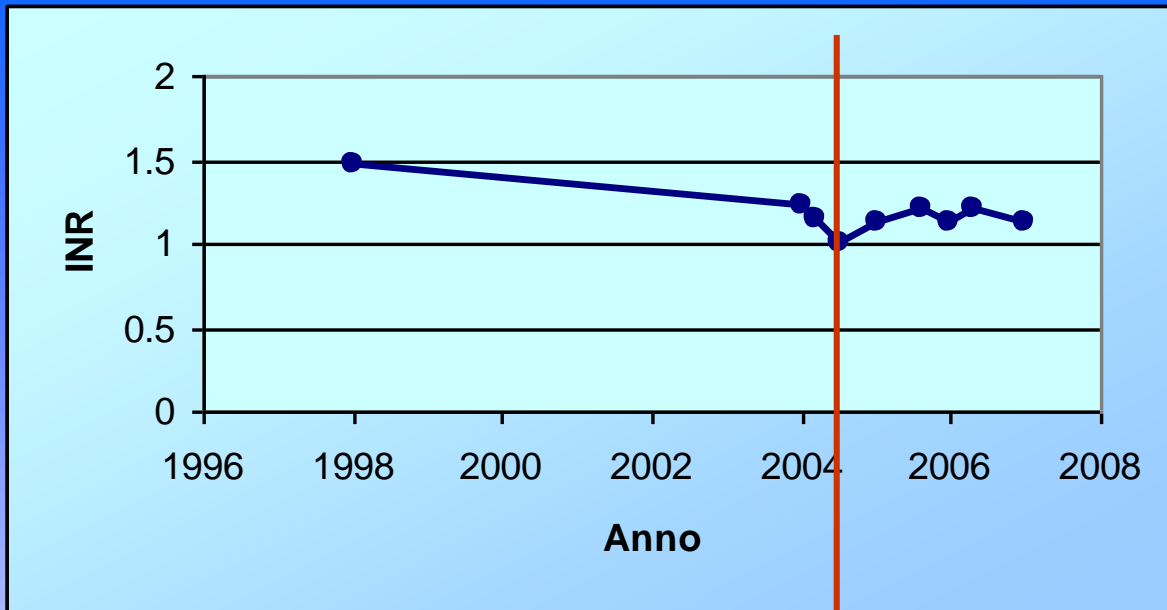
Caso clinico

- Donna di **33 anni**, affetta da GSDIII con coinvolgimento epatico e muscolare.
- A **9 mesi** esordio di **epatomegalia** ed episodi di **ipoglicemia** dopo digiuno prolungato.
- Buona autonomia funzionale fin dall'infanzia.
- Mutazione in doppia eterozigosi sul gene AGL: **1072insT e 4724insAA**
- Una **sorella** con mutazione analoga ma in condizioni cliniche peggiori dal punto di vista muscolare mentre non ha necessitato trapianto di fegato.
- Progressivo accumulo di glicogeno fino ad un quadro severo di **cirrosi epatica** con varici esofagee, splenomegalia, piastrinopenia e leucopenia, al contrario della maggior parte dei pazienti affetti da GSDIII nei quali il danno epatico si stabilizza.
- Nel 2004 (a 30 anni) **trapianto** di fegato e da allora in terapia con Tacrolimus con notevole beneficio dal punto di vista metabolico generale, senza particolari variazioni sul piano della stenia.
- **Quadro clinico stazionario**, con minima impotenza funzionale (**Walton FRS: 2**)

Evoluzione temporale di alcuni parametri ematochimici



Trapianto di fegato



Trapianto

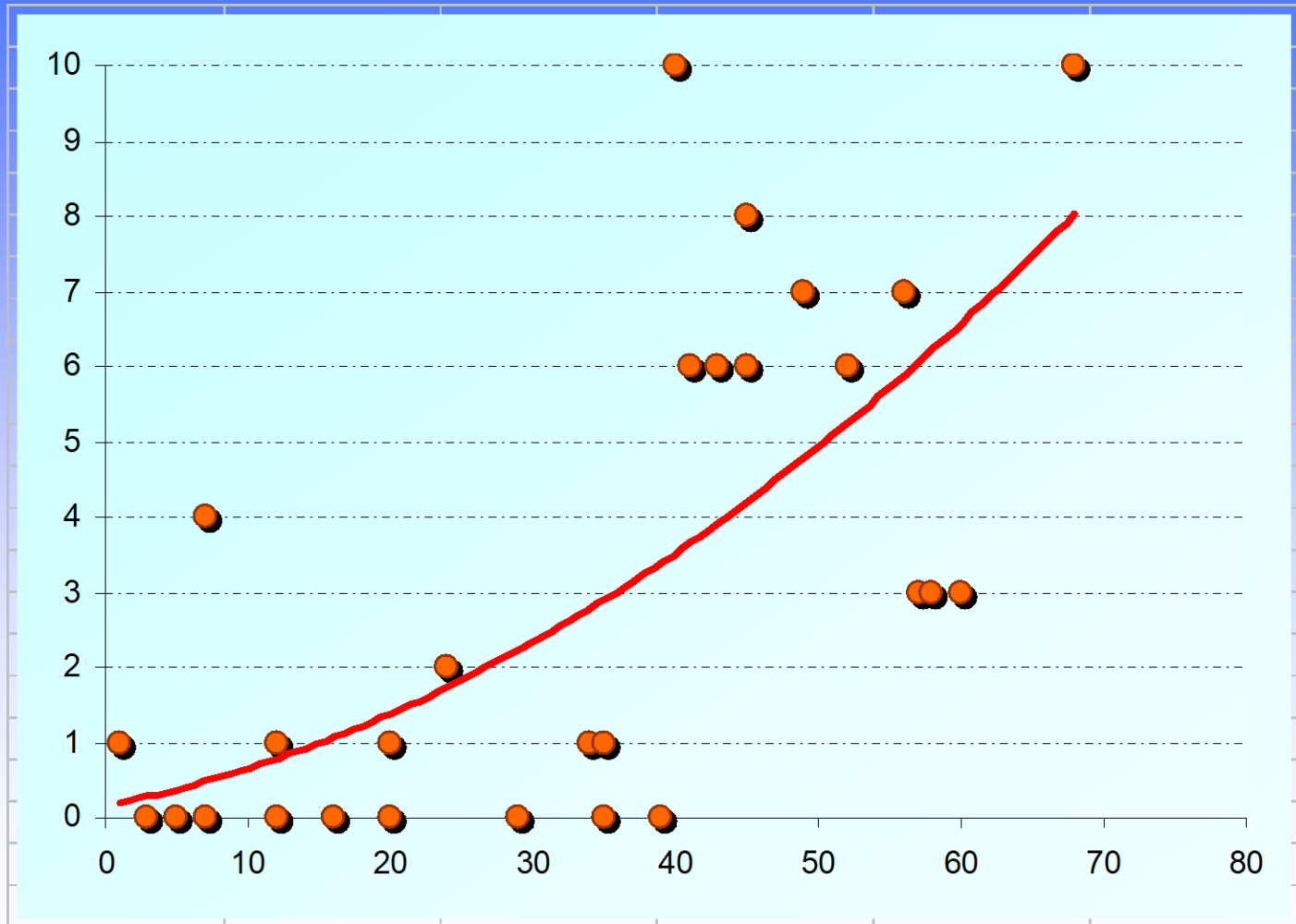
Esame Obiettivo Neurologico (marzo 2007)

•SCM, flessori ed estensori del collo	5- bilat.
•Bicipite	4 e ½ a dx, 4 a sin
•Tricipite	4 e ½ a dx, 4 a sin
•Flessori ed estensori del carpo	5 bilat
•Prensione	4 bilat
•Interossei, adduttore e abduktore del pollice	3 bilat
•Ileoasoas	4 ½ a dx 4 sin
•Quadricipite	4 ½ bilat
•Bicipite femorale	4 ½ bilat
•Gastrocnemio	5 bilat
•Tibiale anteriore	4 bilat

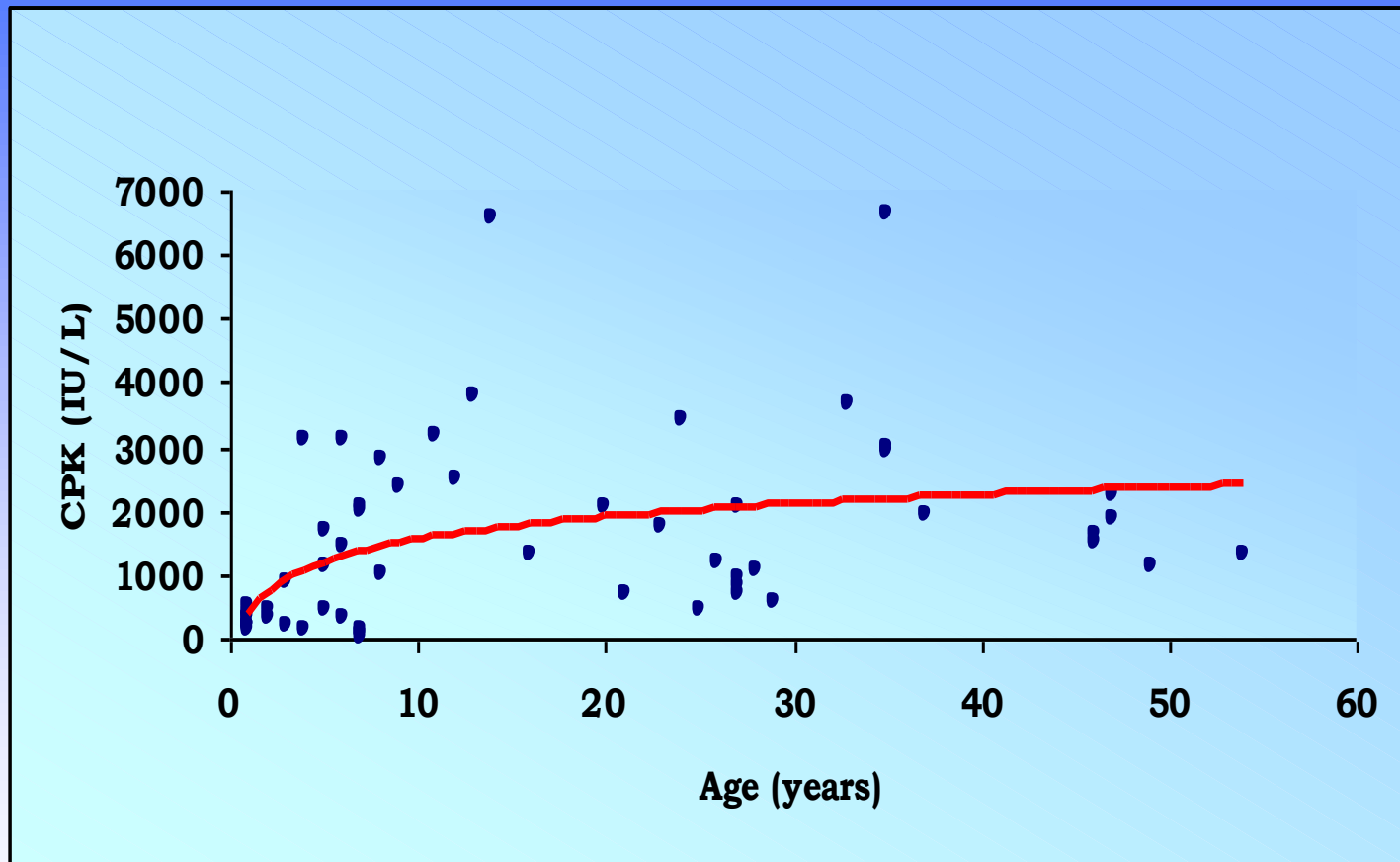
Gardner-Medwin and Walton Modified functional rating scale

- Grado 0 Tutte le funzioni normali, IperCK asintomatica.
- Grado 1 Deambulazione normale, mialgie, atrofia, non corre.
- Grado 2 Difficoltà a camminare su punte dei piedi, difetto di postura o marcia.
- Grado 3 Ipostenia, marcia steppante, sale le scale con corrimano.
- Grado 4 Segno di Gowers.
- Grado 5 Non si alza in piedi se seduto sul pavimento.
- Grado 6 Non sale le scale.
- Grado 7 Non si alza da una sedia.
- Grado 8 Deambulazione impossibile senza sostegno.
- Grado 9 Impossibile mangiare, bere o restare seduto senza aiuto.
- Grado 10 Compromissione muscolatura respiratoria, tetraplegia.

Gardner–Medwin and Walton modified scale of clinical muscle severity score

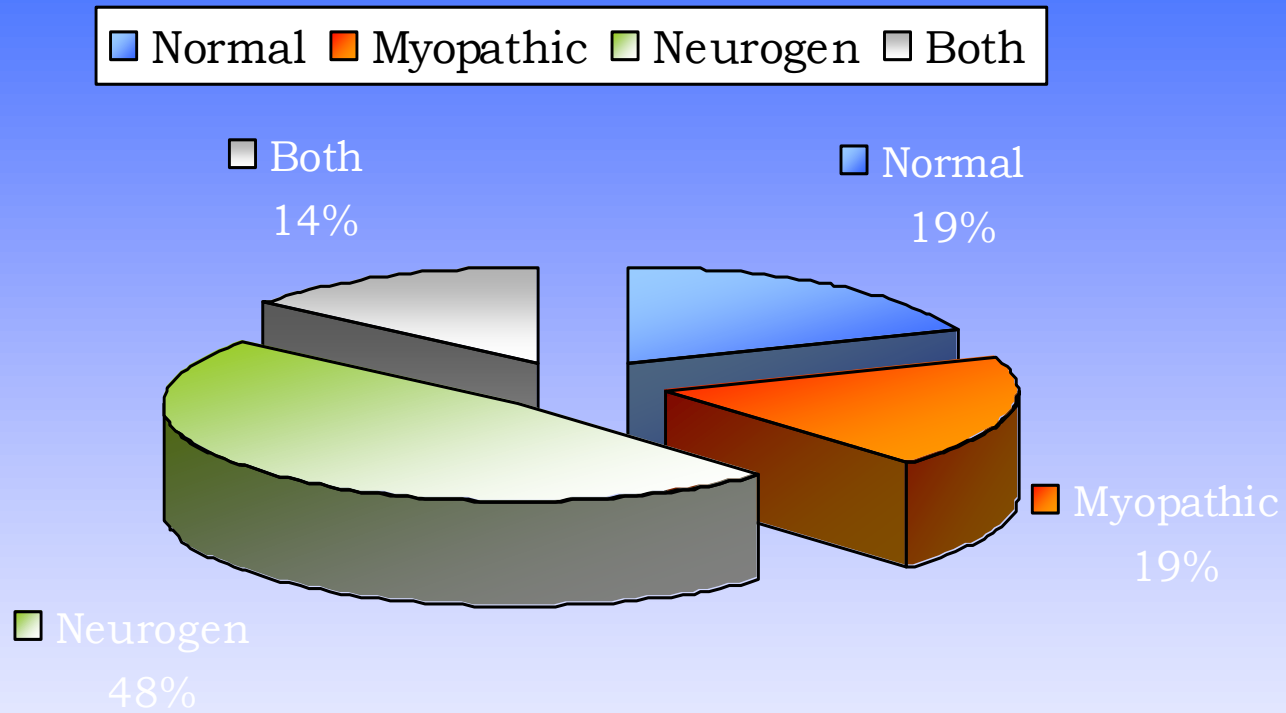


ETA' e VALORI di CPK



Valori Normali < 180 I.U./L

EMG Findings



Dati elettromiografici di 21 pazienti

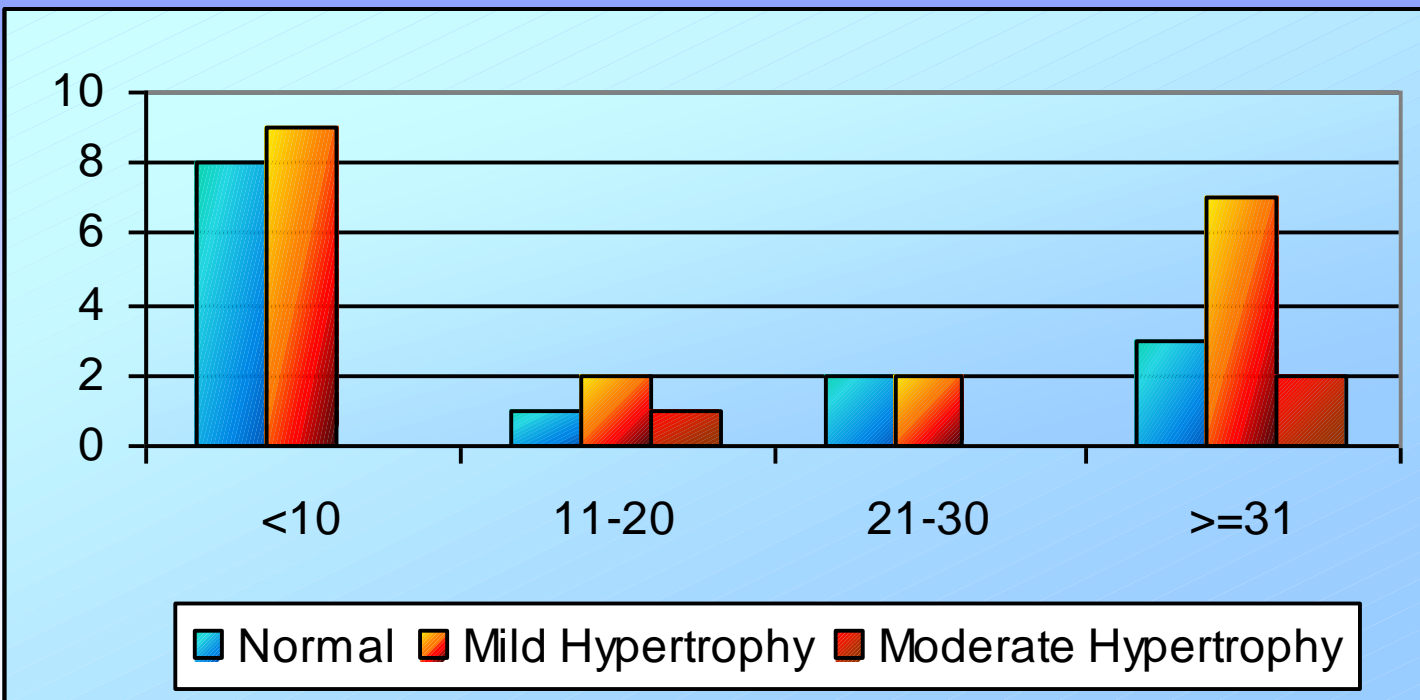
Normal	4
Myopathic	4
Neurogen	10
Both	3

Evoluzione Clinica dell'ipostenia

- Correlazione diretta tra età e progressione dell'ipostenia.
- Limitazione funzionale lieve in pazienti minori di 40 anni (Punteggio Scala di Walton < 2).
- Ampia variabilità negli adulti maggiori di 40 anni (Punteggio Scala di Walton da 3 a 10).
- Ipostenia variabile prossimale e distale con prensione debole, marcia steppante...
- Frequente ipotrofia distale.

Valutazione ecografica dell'ipertrofia cardiaca (Spessore Setto Interventricolare) indicizzato rispetto alla superficie corporea.

Normale	< 10 mm
Lieve	10 - 11 mm
Moderata	12 - 13 mm
Severa	> 14 mm



Ipertrofia cardiaca nei pazienti GSDIII

- **55%** dei pazienti sviluppa una **cardiomiopatia**, ecocardiograficamente simile ad una iniziale **cardiomiopatia ipertrofica idiopatica** (ref. Lee et al. 1997).
- L'ecocardio è in genere normale o mostra lieve ipertrofia cardiaca asintomatica nell prima decade.
- Tra i pazienti nella prima decade, 8 avevano un ecocardio normale (47%), 9 avevano una lieve ipertrofia (53%), mentre nessuno aveva un'ipertrofia cardiaca moderata o severa.
- Nel gruppo di età tra gli 11 e i 20 anni, un paziente aveva un ecocardio normale, 2 avevano lieve e uno moderata ipertrofia.
- Tra i maggiori di 21 anni, abbiamo rilevato 5 pazienti (31%) con ecocardio normale, 9 (56%) con lieve e 1 (6%) con moderata ipertrofia.
- **Un paziente è stato sottoposto a trapianto cardiaco all'età di 45 anni.**
- I nostri dati indicano globalmente un **basso rischio di scompenso cardiaco** e una **lenta evoluzione** del danno cardiaco nei pazienti con deficit di enzima deramificante, ma un **attento follow up annuale** è necessario per identificare soggetti a rischio.

Per indagare la correlazione Genotipo-Fenotipo:

- Non vi sono mutazioni-hotspot, le sostituzioni nucleotidiche sono sparse lungo tutto il gene
- Abbiamo raggruppato i nostri pazienti sulla base della gravità del tipo di mutazione (nonsense, exon-skipping, missense)
- Il 10% dei pazienti sono doppi eterozigoti
- Mutazioni missense al di fuori dei domini funzionali noti sono comunque associate ad un'attività enzimatica abolita
- Non vi sono evidenti relazioni tra la progressione di malattia e la “importanza” dell'alterazione genetica, in parte per il fatto che la maggior parte dei nostri pazienti sono troppo giovani per essere “predittivi” sulla progressione della malattia

Approcci terapeutici

- Neonati e bambini con deficit di enzima deramificante devono essere protetti da episodi di **ipoglicemia a digiuno** con pasti frequenti (ogni 6 ore) ed eventuali **infusioni gastriche notturne di glucosio**.
- **Maizena prima di andare a letto.**
- Durante malattie concomitanti, necessità di un aumentato apporto calorico tramite carboidrati o tramite nutrizione orale/SNG o con glucosio EV (10 mg/kg/min).
- Pasti iperglucidici dovrebbero essere alternati a pasti iperproteici. Ciò permette di controllare la glicemia e garantisce un normale sviluppo ai bambini. (Wolfsdorf 2003).
- Trapianto di fegato o di cuore in pazienti con grave disfunzione di organo.

Esempio di dieta per pazienti in età pediatrica con GSDIII

- Ore 5 Latte intero zuccherato
- Ore 9 Biscotti o yogurt con cereali o latte e biscotti
- Ore 12 Pranzo completo con pasta o riso, carne o pesce + verdura + frutta
- Ore 16 Come alle 9
- Ore 19 Cena, come alle 12
- Ore 23 Latte con biscotti o fette biscottate
- Ore 24 20 g di maizena sciolti in un uguale volume di acqua o in latte fresco, non zuccherato.

**Dino Ferrari Centre,
University of Milan**

Sabrina Lucchiari

Andreina Bordoni

Serena Pagliarani

Domenico Santoro

Sabrina Salani

Stefania Corti

Maurizio Moggio

Costanza Lamperti

Nereo Bresolin

Giacomo P. Comi

**Associazione Italiana
Glicogenosi**

Institute G. Gaslini, Genoa, Italy

Mirella Filocamo

Maja Di Rocco

Rosanna Gatti

Department of Neurosciences, Messina

Carmelo Rodolico

Olimpia Musumeci

Antonio Toscano

Pediatric Inst, University Federico II, Naples

Daniela Melis

Michelina Sibilio

Clinica De Marchi, Milan

Rossella Parini

Pediatria H. San Paolo, Milan

Marta Torcoletti

Sabrina Paci

Meyer Children's Hospital, Florence

Maria Alice Donati