

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE PEDIATRICHE TRASLAZIONALI

XXXV Ciclo

(Anni 2019-2022)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

**RIVALUTAZIONE CRITICA DELLA GESTIONE DELLA
MALATTIA DI WILSON E OTTIMIZZAZIONE DELLA TERAPIA
FARMACOLOGICA CON ZINCO ACETATO**

TUTOR

Chiar.mo

Prof. Raffaele Iorio

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Raffaele Iorio'.

CANDIDATA

Dott.ssa Fabiola Di Dato

Sommario

<i>Capitolo I. Introduzione</i>	5
I.I La malattia di Wilson.....	5
I.II Manifestazioni cliniche differenziate per età.....	6
I.III Aspetti diagnostici.....	7
I.IV Trattamenti disponibili e sperimentali.....	12
I.V Obiettivo della tesi.....	18
 <i>Capitolo II. Dalle linee guida alla pratica clinica: applicabilità al letto del paziente</i>	 20
II.I Introduzione e scopo del lavoro.....	20
II.II Risultati e discussione.....	21
 <i>Capitolo III. Il ruolo della cupruria nel monitoraggio dell'efficacia del trattamento con chelanti e dell'aderenza alla terapia: caso clinico esemplificativo</i>	 24
Pubblicazione.....	25
 <i>Capitolo IV. Ruolo del ridotto intake di rame nel trattamento del paziente con malattia di Wilson</i>	 29
IV.I Introduzione.....	29
IV.II Pazienti e metodi.....	30
IV.III Risultati.....	33
IV.IV Discussione.....	37
 <i>Capitolo V. Salute riproduttiva nei pazienti con malattia di Wilson</i>	 40
V.I Introduzione.....	40
V.II Pazienti e metodi.....	41
V.III Risultati.....	43
V.IV Discussione.....	47
 <i>Capitolo VI. Ottimizzazione della posologia dello zinco in relazione ai parametri del metabolismo di rame e zinco ed agli effetti collaterali</i>	 50
VI.I Introduzione e rationale dello studio.....	50
VI.II Obiettivo dello studio.....	51
VI.III Pazienti e metodi.....	51

VI.IV Risultati	52
<i>VI.IV.I Analisi dell'intera popolazione</i>	53
<i>VI.IV.II Analisi dei due sottogruppi ZnA e ZnS</i>	58
VI.V Discussione	67
<i>Capitolo VII. Considerazioni conclusive</i>	70
<i>Capitolo VIII. Bibliografia</i>	72
<i>Capitolo IX. Lavori in extenso internazionali degli ultimi 3 anni (Novembre 2019- Ottobre 2022)</i>	86

Capitolo I

Introduzione

I.1 La malattia di Wilson

La malattia di Wilson (MW), anche conosciuta come “degenerazione progressiva epatolenticolare” fu descritta per la prima volta nel 1912 dal neurologo americano Kinneer Wilson.(1) È un disordine genetico trasmesso con modalità autosomica recessiva e caratterizzato dall'eccessivo accumulo di rame in vari organi e apparati, principalmente fegato, sistema nervoso centrale e occhio.(2, 3) La prevalenza mondiale della malattia di Wilson è di circa 1 su 30.000 nati vivi;(4) in Italia, la maggiore incidenza del morbo di Wilson è riscontrata in Sardegna (1: 3000-8700).(4, 5)

Il gene responsabile della malattia di Wilson è localizzato sul cromosoma 13, nella regione 13q14-13q21, e codifica per la proteina ATP7B.(6, 7) Essa è una proteina di membrana espressa primariamente nel fegato, il cui ruolo è quello di regolare il trasporto del rame ed in particolare favorire la fuoriuscita del metallo dalle cellule.(8) Il rame introdotto con la dieta è generalmente in eccesso rispetto al fabbisogno giornaliero ed il suo metabolismo è regolato in gran parte dall'aumento dell'escrezione in condizioni di accumulo.(9) Esso viene assorbito principalmente a livello del duodeno e del tenue prossimale; a livello dell'enterocita il rame è legato alla metallotioneina e viene perso con la desquamazione dell'epitelio intestinale con il conseguente “blocco mucosale” dell'assorbimento. L'escrezione dall'organismo del 98% del rame avviene a carico del sistema biliare.(10) L'ATP7B ha due principali funzioni: mediare il trasporto del rame nel Trans-Golgi per la sintesi della ceruloplasmina ed esportare il rame dalla cellula.(11, 12) Sono state descritte più di 250 mutazioni del gene ATP7B che determinano: alterata funzione dell'ATPasi di trasporto del rame; alterata localizzazione dell'ATP7B nell'epatocita; inibizione delle modifiche post-trascrizionali dell'ATP7B; interferenza con i meccanismi di interazione proteina-proteina.(10) Il deficit di escrezione del rame nella bile e la mancata incorporazione del metallo nell'apoceruloplasmina causano mancata formazione della ceruloplasmina funzionale. Data la ridotta emivita

dell'apoceruloplasmina, nella maggioranza dei pazienti con MW i livelli sierici di ceruloplasmina sono ridotti, rappresentando questo un test di primo livello per la diagnosi di MW come descritto per la prima volta da Schienberg e Gitlin nel 1952.(13, 14) L'ipoceruloplasminemia determina di conseguenza bassi livelli di cupremia ed elevata cupruria per l'aumentata escrezione nelle urine della frazione libera del metallo. La compromissione della normale escrezione del rame epatico dà luogo ad un accumulo di tale metallo in diversi organi e apparati tra cui fegato, encefalo, cornea, reni, scheletro.(2) La presentazione clinica della malattia è molto varia con un quadro clinico frequentemente aspecifico ed eterogeneo.(15) Da ciò deriva la necessità di mantenere un alto indice di sospetto così da formulare diagnosi precoci ed iniziare un tempestivo trattamento utile ad impedire l'inevitabile progressione della malattia.(16) La prognosi della MW è dunque fortemente dipendente da una diagnosi precoce e da un trattamento adeguato che consentono una sopravvivenza sostanzialmente sovrapponibile a quella della popolazione generale.(16-20)

In merito al trattamento farmacologico, attualmente due classi di farmaci sono disponibili in commercio: i chelanti orali del rame ed i sali di zinco. Il trattamento deve essere proseguito per tutta la vita; in caso di sospensione prolungata segue inevitabilmente la progressione di malattia fino all'exitus.(16)

I.II Manifestazioni cliniche differenziate per età

Le manifestazioni cliniche della MW sono estremamente variabili: epatopatia cronica o insufficienza epatica acuta, neuropatia, patologia psichiatrica, anemia emolitica Coombs negativa, nefropatia, alterazioni oculari ed altre.(21-34) L'età di esordio delle manifestazioni può essere molto varia, sebbene nella maggior parte dei casi la malattia si presenti tra i 3 e i 35 anni.(17) In età pediatrica la sintomatologia caratteristica d'esordio è quella epatica.(35) L'epatopatia può manifestarsi con molteplici quadri clinici: dall'ipertransaminasemia e/o epatomegalia isolata, con possibile steatosi all'esame ecografico, a quadri di epatite acuta itterica simulanti epatiti virali acute o indistinguibili dall'epatite autoimmune, a quadri di epatite fulminante, alla cirrosi con variabile grado di insufficienza epatocellulare accompagnata da segni come splenomegalia o complicanze secondarie allo sviluppo di ipertensione portale quali

emorragie digestive ed ascite. In Italia è alta la percentuale dei casi riferiti per ipertransaminasemia isolata e tale fenomeno è spiegato dal fatto che la valutazione biochimica delle transaminasi viene praticata durante esami effettuati nel corso di controlli di routine, prima di interventi chirurgici minori e nella gestione di bambini con sintomi aspecifici.(36, 37)

La malattia psichiatrica è più comunemente presente a partire dall'età adolescenziale, mentre quella neurologica negli adulti.(18) Le manifestazioni neurologiche della MW sono molto rare prima dei 10 anni, presentandosi tipicamente durante l'adolescenza e nella terza decade di vita, talvolta precedute da sintomi psichiatrici. Non sempre la malattia di fegato è clinicamente evidente nei pazienti con MW ad esordio neurologico.(38, 39) I sintomi neurologici/psichiatrici di maggior riscontro nella pratica clinica sono: cambiamenti di personalità, deterioramento del rendimento scolastico, irritabilità, psicosi, depressione, ansia, alterazioni del comportamento, incoordinazione motoria, alterazioni della scrittura (micrografia), tremore a riposo ed intenzionale, prima unilaterale poi generalizzato, disartria, disfagia, facies amimica, eccessiva salivazione, rigidità, disautonomia, disturbi intestinali.(2, 17) Sintomi neurologici meno comuni sono: convulsioni, sintomi piramidali, incontinenza urinaria, mioclonie.(40) I quadri di presentazione neurologici sono stati classificati in 3 sottogruppi che correlano i sintomi neuropsichiatrici alla RMN encefalo:(40)

a) *pseudoparkinsonismo*: include pazienti con bradicinesia, alterazioni cognitive, disturbi dell'umore e correla con dilatazione del terzo ventricolo;

b) *pseudosclerosi*: include pazienti con atassia e tremori ed è caratterizzata da lesioni focali del talamo;

c) *discinesia*: include pazienti con discinesia, disartria e disturbi della personalità e correla con lesioni focali nel putamen e nel globo pallido.

Si stima che la percentuale di pazienti con esordio epatico versus neurologico è rispettivamente dell'83% vs 17% prima dei 10 anni, 52% vs 48% tra i 10 e i 18 anni, 24% vs 75% dopo i 18 anni.(41)

I.III Aspetti diagnostici

La diagnosi precoce della MW è di fondamentale importanza ai fini della prognosi. Infatti, il trattamento, se iniziato precocemente, impedisce l'insorgenza di lesioni gravi ed irreversibili legate all'accumulo di rame nei vari organi. Linee guida americane, europee ed indiane sono disponibili per indirizzare il clinico sul giusto approccio diagnostico e terapeutico nella MW.(17, 42, 43) Nel 2018 è stato pubblicato anche un position paper sulla MW di età pediatrica.(44) Del 2022 sono invece le linee guida britanniche e una guidance americana sull'approccio multidisciplinare alla patologia, la gestione diagnostica e terapeutica, e soprattutto sul monitoraggio dei pazienti nel corso del follow-up.(21, 45)

Per fare diagnosi di malattia di Wilson è importante mantenere alto l'indice di sospetto e combinare l'esito di più segni, sintomi e test diagnostici quali, in particolare, la ceruloplasmina sierica e la cupruria valutata nelle 24 ore. La conferma diagnostica è poi data dalla concentrazione del rame epatico aumentata o dal riscontro di una mutazione in omozigosi o due mutazioni in eterozigosi composta del gene ATP7B. Per agevolare la formulazione della diagnosi, nel 2003 Ferenci et al. hanno proposto uno score (**Tabella 1**) che si compone di elementi clinici, biochimici, istologici e genetici.(46) Un punteggio superiore a 4 consente di porre diagnosi di morbo di Wilson; se compreso tra 2 e 3 la malattia è probabile, ma il paziente deve essere ulteriormente indagato; se, infine, il punteggio finale è 1 o 0 la diagnosi è improbabile. Lo score è stato validato in una popolazione pediatrica da Dhawan nel 2005. Questo studio retrospettivo ha documentato una sensibilità dello score pari al 98.14%, una specificità del 96.59%, un valore predittivo positivo di 94.64% e un valore predittivo negativo di 98.83% nei bambini affetti da malattia di Wilson.(47) Considerata la possibilità di falsi positivi, in particolare in pazienti con epatite autoimmune, lo score va comunque adoperato da clinici esperti nella formulazione della diagnosi e nella gestione terapeutica della patologia. Questo anche perché alcune delle manifestazioni cliniche incluse nello stesso possono non essere esclusive della MW. Basti pensare all'anello di Kayser-Fleischer, solitamente più comune negli adulti e nei pazienti ad esordio neurologico, che sebbene fortemente sospetto per MW, può talvolta essere presente anche in caso di epatopatie colestatiche di diversa natura.(16, 21) Ancor meno affidabile è l'applicazione dello score in pazienti con epatite fulminante a causa dei ridotti livelli di ceruloplasmina per

l'insufficienza protidosintetica epatica e degli elevati valori di cupruria per la marcata citolisi. In questo caso, la MW va sospettata se c'è una dissociazione tra i bassi valori della fosfatasi alcalina e quelli elevati della bilirubina totale. Nei pazienti pediatrici con epatite fulminante infatti, la diagnosi può essere suggerita dal rapporto fosfatasi alcalina/bilirubina totale inferiore a 4 e un rapporto AST/ALT >2.2.(48)

Tabella 1. Score diagnostico per malattia di Wilson (modificato da Ferenci et al. 2003).(46)

Sistema a punti per la diagnosi di morbo di Wilson		Punti
Anello di Kaiser-Fleischer		
Presente		2
Assente		0
Coinvolgimento neurologico o pattern tipico alla RMN dell'encefalo		
Severo		2
Moderato		1
Assente		0
Anemia emolitica Coombs negativa		
Presente		1
Assente		0
Cupruria (in assenza di epatite acuta)		
Normale		0
1-2x ULN*		1
>2x ULN		2
Normale, ma >5x ULN dopo carico di penicillamina		2
Determinazione quantitativa del rame epatico (in assenza di colestasi)		
Normale		-1
<5x ULN		1
>5x ULN		2
Epatociti positivi al test di colorazione con rodanina**		
Presenti		1
Assenti		0
Ceruloplasmina sierica		
Normale		0
10-20 mg/dl		1
<10 mg/dl		2
Analisi molecolare		
Mutazioni su entrambi i cromosomi		4
Mutazione su un solo cromosoma		1
Nessuna mutazione		0

INTERPRETAZIONE DELLO SCORE:

≥ 4 = affetto da malattia di Wilson.

2-3 = malattia di Wilson probabile, sono richiesti ulteriori approfondimenti.

0-1 = malattia di Wilson improbabile.

*ULN = Limite superiore della norma

** Test da eseguire solo se la misurazione del rame epatico non è disponibile

La MW deve essere sospettata e ricercata in bambini di età superiore ad 1 anno che presentino segni di epatopatia quali che siano da un aumento asintomatico delle transaminasi a cirrosi con epatosplenomegalia e ascite o insufficienza epatica acuta, in ogni paziente con malattia epatica inspiegabile in combinazione con disturbi neurologici o neuropsichiatrici ed in qualsiasi adolescente con disturbi cognitivi, psichiatrici o del movimento inspiegabili. Inoltre, tutti i parenti di primo grado dei pazienti affetti dovrebbero essere indagati per la MW.(44)

L'ipertransaminasemia è spesso la prima alterazione della malattia di Wilson, sia come ipertransaminasemia isolata, sia associata alla presenza di epatomegalia, sebbene possa essere assente in caso di diagnosi molto precoce. Il grado di elevazione delle transaminasi potrebbe comunque non riflettere il grado di severità della malattia epatica e tanto meno quello della malattia neurologica, qualora presente.(43)

Sicuramente utile per la diagnosi e primo test diagnostico da effettuare nel sospetto di MW è il dosaggio della *ceruloplasmina sierica*, proteina di 132 KDa sintetizzata principalmente nel fegato, solitamente ridotta nei pazienti affetti da MW a causa della breve emivita dell'apoceruloplasmina. Sebbene valori inferiori a 10 mg/dl siano considerati diagnostici, già valori <20 mg/dl sono da considerarsi fortemente sospetti per la MW in presenza di segni e sintomi associati.(44) Bisogna tenere presente che fino al 20% dei pazienti, adulti e bambini, presenta valori di ceruloplasmina normali e che il 20% dei soggetti eterozigoti per mutazioni di ATP7B possono presentare ipoceruloplasminemia.(17) La ceruloplasmina può poi essere falsamente normale in pazienti con epatite cronica istologicamente attiva da MW o ridotta a causa di altre patologie quali ipoceruloplasminemia familiare, protidodispersione enterica o renale, difetti congeniti della glicosilazione delle proteine.(2, 21, 49) I livelli della ceruloplasmina sono fisiologicamente molto bassi nel lattante, con un picco nella prima infanzia (approssimativamente intorno ai valori di 30-50 mg/dL) e successivamente raggiungono un plateau intorno ai valori normali dell'adulto.(50)

Recentemente è stata valutata l'accuratezza diagnostica della ceruloplasmina considerando tre distinti cut-off: <20 mg/dl; <14 mg/dl; <10 mg/dl. Da questa analisi è emerso che un cut-off di 14 mg/dl consentirebbe un'accuratezza diagnostica ottimale raggiungendo un valore predittivo positivo del 100% e un valore predittivo negativo del 97.1%.(51)

Altro parametro attenzionato come test diagnostico e per il monitoraggio del paziente con MW è la *frazione libera del rame*. La sua stima si effettua mediante la formula “cupremia totale in $\mu\text{g/dL}$ – (ceruloplasmina in $\text{mg/dL} \times 3$)”.(17) Tuttavia, esso non è ancora utilizzato di routine universalmente nella pratica clinica. Nel secondo capitolo di questo elaborato di tesi ne descriveremo in modo più dettagliato le criticità.

La *cupruria basale delle 24 ore* è un altro parametro utile per la diagnosi di MW. Il rame urinario riflette la quota del rame libero (non legato alla ceruloplasmina) circolante nel plasma. Diversi studi hanno contribuito negli anni a definire il cut-off a 100 $\mu\text{g}/24$ ore negli adulti sintomatici e 40 $\mu\text{g}/24$ ore nei bambini.(16, 25, 52, 53)

Il solo dato di cupruria elevata non è diagnostico; infatti, valori superiori a 100 $\mu\text{g}/\text{die}$ possono essere riscontrati, oltre che nella MW, anche in condizioni di epatopatia croniche severe, in particolare l'epatite autoimmune.(2, 54) I soggetti eterozigoti possono avere valori intermedi di cupruria (tra 40 e 100 $\mu\text{g}/24\text{h}$).

La *cupruria delle 24 ore dopo carico di D-penicillamina*, in passato utilizzata come valido test diagnostico, ad oggi ha perso parte della sua importanza.(43, 52, 55, 56)

La *determinazione quantitativa del rame epatico* rimane una delle metodiche più accurate per la diagnosi. Una concentrazione di rame a livello epatico superiore a 250 $\mu\text{g/g}$ di peso secco (v. n. <50 $\mu\text{g/g}$ di peso secco) è altamente indicativa della malattia di Wilson.(17) La concentrazione del rame epatico negli eterozigoti, sebbene frequentemente supera i valori normali, non eccede in genere i 250 $\mu\text{g/g}$. Raramente è possibile avere falsi negativi (ad esempio: nelle fasi avanzate della malattia quando la distribuzione epatica del rame è disomogenea, in caso di eccessiva steatosi o fibrosi, per errato campionamento) o falsi positivi (epatopatie colestatiche di diversa natura). Nonostante la sua ridotta accuratezza, la *colorazione istochimica con la rodanina* per evidenziare la presenza di rame nel fegato è ancora considerata tra i criteri diagnostici per la malattia di Wilson sebbene abbia scarsa attendibilità.

Le *anomalie ultrastrutturali precoci*, rilevabili con le tecniche di microscopia elettronica, sono evidenziabili a livello del mitocondrio, i cui cambiamenti sono sufficientemente specifici da assumere un valore diagnostico nella malattia di Wilson sebbene non utilizzati.(57, 58) Le alterazioni del mitocondrio scompaiono in seguito alla terapia con penicillamina.(59) Spesso si riscontra aumento del numero di lipolisosomi; occasionalmente viene riscontrata iperplasia delle cellule del Kupffer.(60)

La valutazione del tasso di incorporazione degli isotopi del rame nella ceruloplasmina non è un test praticato di routine.(61)

In merito all'*analisi genetica dell'ATP7B*, molte mutazioni sono state descritte e la più frequente nel mondo sembra essere la H1069Q.(62) Alcune mutazioni specifiche sono più comuni in determinati gruppi etnici; tuttavia, più della metà delle mutazioni sono molto rare nella popolazione generale. Tale elevato grado di eterogeneità suggerisce che la maggior parte degli individui affetti sono doppi eterozigoti.(63)

L'analisi molecolare è ormai considerato il "gold standard" in età pediatrica per la conferma diagnostica ed è frequentemente utilizzata nei pazienti con diagnosi certa di malattia di Wilson al fine di indagare i familiari consanguinei e di identificare tra di essi gli eventuali presintomatici.(44) L'analisi dell'aplotipo risulta particolarmente utile per lo screening dei parenti di primo grado di pazienti affetti dalla malattia di Wilson, in cui i marker microsatelliti sono informativi.(64) In Sardegna, dove la malattia di Wilson ha un'incidenza di 1 su 3000 nati vivi, l'aplotipo più comune riscontrato è costituito da una delezione di 15-nucleotidi a carico della regione promoter.(5) L'analisi dell'aplotipo ha, inoltre, avuto un ruolo indispensabile anche nell'identificazione di nuove mutazioni.(65) Se è noto che gli omozigoti per la mutazione H1069Q presentino un esordio più tardivo con una malattia principalmente neurologica, nessuna correlazione genotipo-fenotipo è stata dimostrata rispetto all'età alla diagnosi e al tipo d'esordio della MW in età pediatrica.(63, 66, 67)

I.IV Trattamenti disponibili e sperimentali

L'approccio al trattamento (farmaco di scelta e dosaggio) della MW dipende dalla presenza di evidenze cliniche o laboratoristiche o istologiche della malattia, dal tipo di

esordio epatico o neurologico e dal momento della diagnosi, che può precedere o seguire la comparsa dei sintomi. La terapia è basata sull'utilizzo di chelanti del rame (penicillamina e trientina) che ne promuovono l'escrezione dall'organismo, e/o di zinco che ne riduce l'assorbimento.(68-70)

Il primo agente chelante ad essere introdotto nel 1951 per il trattamento della MW fu il British anti-Lewsite (BAL o dimercaptoprololo), somministrato per via intramuscolare.(71, 72) L'identificazione da parte di Walshe nel 1956 di un chelante orale, la D-penicillamina, rivoluzionò il trattamento di questo disordine.(68) Questo farmaco oltre ad aumentare l'escrezione del rame nell'urina, conducendo ad un bilancio del rame negativo, induce nel fegato ed in altri tessuti un aumento delle metallothioneine che legano il rame in forma non tossica. Sebbene il razionale del suo impiego come trattamento iniziale della malattia di Wilson sia l'effetto "decopperizzante", è noto che, come la terapia con zinco, anche quella con penicillamina non determina una riduzione significativa dei livelli di rame epatico.(73, 74) Oggi la sua efficacia è ben documentata, sebbene il chelante possa determinare vari effetti collaterali quali: reazioni di ipersensibilità precoce o acuta con febbre, linfadenopatia, eruzioni cutanee, elastosi perforans serpiginosa, neutropenia o trombocitopenia, sindrome di Goodpasture, nefrotossicità con proteinuria, *reazione lupus-like*, lesioni pemfigoidi, *lichen planus*, stomatite aftosa, sindrome di *miastenia gravis-like* e polimiositi.(18, 75-79)

Il trattamento con D-penicillamina deve essere iniziato con bassi dosaggi per poi incrementarli progressivamente fino alla dose voluta per il paziente; ciò è dovuto al rischio di slatentizzazione o paradossale peggioramento dei sintomi neurologici.(80)

La dose prescritta in età pediatrica è di 20 mg/kg/die.(44) Nei giovani adulti il dosaggio è di 1 g/die e può essere aumentato fino ai 2 g/die in caso di assente miglioramento clinico. Il dosaggio di mantenimento è generalmente di 750-1000 mg/die in due dosi. L'escrezione avviene prevalentemente per via renale.(17) L'assorbimento della penicillamina è ridotto di circa il 50% se viene assunto con i pasti, per cui va assunta 1 ora prima o 2 ore dopo i pasti.(81)

Dopo l'inizio del trattamento con la penicillamina, la ceruloplasmina tende a ridursi per rimanere bassa o riaumentare con il tempo, soprattutto nei pazienti con severa epatopatia che in risposta al trattamento riacquistano la capacità di sintetizzarla. Invece, la

persistente riduzione dei livelli di ceruloplasmina in pazienti trattati cronicamente con penicillamina può essere indicativa di un'eccessiva decopperizzazione e può spesso associarsi a neutropenia, anemia sideroblastica ed emosiderosi.(82) Nel monitoraggio del paziente in trattamento con penicillamina è utile valutare la cupruria basale che deve mantenersi intorno ai 200-500 µg/24 h. Valori inferiori ai 200 µg/24 h possono essere indicativi sia di non aderenza al trattamento sia di overtrattamento. Per differenziare queste due situazioni può essere utile la valutazione della frazione di rame libero la quale, se supera i 15 µg/dL, indica che il paziente non è aderente alla terapia; viceversa valori inferiori a 5 µg/dL sono riferibili all'overtrattamento.(17) Per i pazienti con un'epatopatia sintomatica l'evidenza di un miglioramento dei test di funzionalità epatica è attesa durante i primi 2-6 mesi di trattamento, ma un ulteriore miglioramento si può registrare in tutto il primo anno di terapia.(75)

La trientina è un altro chelante del rame approvato nel 1985 dalla FDA come farmaco di seconda scelta per i pazienti intolleranti alla penicillamina sebbene si sia mostrato efficace anche come terapia iniziale.(42, 83, 84) La maggioranza degli effetti collaterali imputabili alla penicillamina non si verifica con tale farmaco ad eccezione del LES. L'effetto collaterale più comunemente riportato è l'anemia sideroblastica. Come la penicillamina, anche la trientina può determinare un peggioramento o una slatentizzazione dei sintomi neurologici, ma ciò sembra essere molto meno comune. Il dosaggio raccomandato è di 750-1500 mg/die per la terapia iniziale e 750-1000 mg/die per la terapia di mantenimento, da somministrare due volte al giorno. Pochi dati esistono riguardo la sua farmacocinetica; il monitoraggio della terapia corrisponde esattamente a quello descritto per l'altro chelante.(42, 69, 85, 86)

Dal 1997, la FDA ha approvato per il trattamento della malattia di Wilson anche i sali di zinco. Il meccanismo d'azione dello zinco è quello di bloccare l'assorbimento intestinale di rame attraverso l'induzione di metallotioneine a livello degli enterociti. Lo zinco agisce anche inducendo le metallotioneine epatiche.(87-89) Il rame legato nell'enterocita non viene assorbito, ma è eliminato con le feci nel momento in cui gli enterociti sono persi con il normale turnover intestinale.(90) Come la D-penicillamina, il farmaco andrebbe somministrato lontano dai pasti, poiché l'assorbimento intestinale è ridotto dal cibo.(70, 91) Il principale effetto collaterale è rappresentato dalla piroisi

gastrica; a tal proposito lo zinco acetato appare meglio tollerato rispetto allo zinco solfato. La dose in termini di zinco elementare è di 25 mg due volte al giorno nei bambini con meno di 6 anni, 25 mg per tre volte al giorno nei bambini di età compresa tra i 6 e i 16 anni o con un peso corporeo inferiore ai 50 Kg, 50 mg per tre volte al giorno in pazienti con più di 16 anni o di peso superiore ai 50 kg. Va considerato che 25 mg di zinco elementare corrispondono a 100 mg di zinco solfato, mentre la dose è la stessa se si somministra lo zinco acetato.(92, 93) Lo zinco può avere effetti immunosoppressivi e ridurre la chemiotassi leucocitaria, sebbene Brewer et al., in un solo studio, abbiano documentato l'assenza di effetti avversi sulla funzione linfocitaria nei pazienti trattati cronicamente.(94) Lo zinco sembra inoltre responsabile di aumentati livelli sierici di amilasi e lipasi, in assenza di evidenze cliniche o radiologiche di pancreatite.(95)

I livelli di cupruria e di zincuria rappresentano un utile parametro di efficacia e di aderenza alla terapia con lo zinco. Valori di cupruria inferiori a 75 µg/die sono indicativi di un buon controllo della malattia.(17, 96) Nel caso in cui la cupruria scenda al di sotto di 30 µg/24h è doveroso sospettare un overtrattamento.(44) La zincuria non dovrebbe essere inferiore a 2 mg/die e la zinchemia dovrebbe superare i 125 µg/dL; valori inferiori di zincuria e zinchemia sono indicativi di scarsa compliance.(17)

Lo zinco è stato usato per la prima volta nel trattamento della malattia di Wilson nel 1961 ed il suo sale acetato, gluconato o solfato, somministrato per via orale, è rapidamente diventato il trattamento di scelta nei pazienti presintomatici e per la terapia di mantenimento.(70, 97-102) Lo zinco potrebbe anche avere un ruolo come trattamento di prima scelta nei pazienti con esordio neurologico: diversi studi infatti hanno dimostrato la sua efficacia come terapia iniziale nei pazienti con tale sintomatologia.(42, 102, 103) Non c'è un accordo unanime sull'efficacia del trattamento di prima scelta con lo zinco nei bambini con malattia di Wilson ad esordio epatico. Diversi studi hanno supportato il suo utilizzo in pazienti adulti e bambini con esordio epatico e asintomatici.(99, 104, 105) Altri ne hanno descritto l'efficacia in pazienti con epatopatia severa scompensata.(106, 107) L'utilità terapeutica dello zinco è stata messa in discussione da Weiss et al. che hanno descritto, in una ampia casistica di pazienti, una minore efficacia della monoterapia con zinco rispetto all'utilizzo degli agenti chelanti, sia nel prevenire l'evoluzione dell'epatopatia sia nel permettere una maggiore

sopravvivenza in assenza di epatotraspianto.(108) Sebbene l'ampia casistica, l'inefficacia dello zinco potrebbe essere ascrivibile alla presenza di alcuni bias, tra i quali per esempio il fatto che molti dei casi in cui è stato riportato il fallimento terapeutico con zinco si sono verificati in pazienti con scarsa aderenza alla terapia. Altro bias potrebbe essere che nello studio sono stati reclutati pazienti che avevano iniziato la terapia in età adulta, quando ovviamente l'espressione epatica è più grave. Uno studio retrospettivo da noi condotto nel 2014 ha nuovamente confermato l'efficacia dello zinco in monoterapia nel controllo della sintomatologia epatica in pazienti con epatopatia lieve diagnosticata in età pediatrica. I dati di tale studio riportano un tasso di insuccesso di terapia del 28% per la penicillamina, del 36% per la terapia combinata e del 12% per lo zinco. Anche nei pazienti in cui lo zinco era utilizzato come terapia di mantenimento, esso dimostrava una buona efficacia nel controllo della patologia.(109) Nel 2016, abbiamo inoltre descritto come 38 pazienti senza manifestazioni neurologiche, tutti diagnosticati e trattati precocemente, non presentassero segni neurologici alla valutazione clinica, subclinica e di imaging dopo un lungo follow-up.(110)

La terapia di combinazione, in cui lo zinco viene somministrato insieme con l'agente chelante, ha una base teorica in quanto consente contemporaneamente di bloccare l'assorbimento del rame da un lato e favorire l'escrezione del rame in eccesso dall'altro. Va però precisato che i due farmaci, onde evitare che interferiscano reciprocamente, vanno somministrati a distanza di alcune ore nel corso della giornata.(111) Secondo le più recenti raccomandazioni dell'ESPGHAN Hepatology Committee, queste terapie di combinazione (zinco e penicillamina o zinco e trientina) sono efficaci nel ridurre la necessità di trapianto epatico nei bambini con epatopatia cronica scompensata.(44)

Sebbene non ci siano chiare evidenze che la dieta influenzi l'età di esordio o la severità della malattia, è consigliata, accanto alla terapia farmacologica, l'eliminazione dall'alimentazione dei cibi ricchi di rame (cioccolato, crostacei, nocciole, funghi, fegato, legumi, etc) e di acqua ad elevato contenuto di tale metallo almeno nel primo anno di terapia, in pazienti in trattamento con chelanti.(17, 42, 44)

Il trapianto ortotopico di fegato rappresenta una terapia necessaria e definitiva per i pazienti affetti da malattia di Wilson con insufficienza epatica fulminante o cirrosi scompensata non responsiva al trattamento.(17) Dopo il trapianto non è necessario per

il paziente proseguire il trattamento chelante o con sali di zinco. Al momento, controversa è l'indicazione per i pazienti con fenotipo esclusivamente neurologico.(21) Per quanto riguarda i trattamenti non ancora approvati, il tetratiomolibdato è un potente chelante del rame con duplice meccanismo di azione: quando somministrato col pasto agisce come inibitore dell'assorbimento del rame a livello intestinale; quando somministrato tra i pasti la quota di farmaco che viene assorbita forma, invece, dei complessi con l'albumina e il rame nel sangue, prevenendo l'uptake cellulare del metallo e mobilizzando il rame dai depositi tissutali.(21) Al momento esso non è disponibile in commercio in Italia; la principale indicazione sembra essere nei pazienti neurologici adulti.(112) In un trial a doppio cieco, che ha comparato la trientina al tetratiomolibdato, entrambi sono risultati efficaci nel migliorare la sintomatologia dei pazienti e la percentuale di deterioramento neurologico è risultata rispettivamente del 26% versus il 4%.(85) Non sono stati osservati effetti collaterali gravi; tra essi, da segnalare depressione midollare, disturbi endocrini ed epatotossicità che spesso si risolvono con la sospensione temporanea del trattamento.(85)

Gli antiossidanti, e principalmente la vitamina E, potrebbero avere un ruolo come trattamento aggiuntivo nella MW dato che bassi livelli sierici ed epatici di vitamina E sono stati rilevati nei pazienti.(113-115) Le basi teoriche per questo tipo di trattamento sono rappresentate dal danno ossidativo indotto dal rame nel fegato di topi e dalla dimostrazione che l'alfa-tocoferolo (vitamina E) protegge gli epatociti di ratto dalla tossicità del rame.(116, 117) Altri antiossidanti che potrebbero determinare benefici ai pazienti con MW sono Vitamina C, N-acetilcisteina e curcumina.(21, 118)

È stata anche dimostrata in vitro la capacità di chaperonine farmacologiche di ripristinare, almeno in parte, l'espressione dei mutanti più frequenti della proteina ATP7B. Un'altra prospettiva per il futuro è quella della terapia genica, per la quale è molto alta l'attenzione scientifica e per cui trial terapeutici sono attualmente in corso.(119, 120)

Il trattamento della malattia di Wilson è in grado di bloccare la progressione e quindi di evitare l'evoluzione verso la cirrosi epatica ed il danno neurologico severo. L'obiettivo terapeutico è quello di ripristinare e mantenere l'omeostasi del rame. La terapia farmacologica della malattia di Wilson deve quindi essere proseguita per tutta la

vita. Paradossalmente, la long-term therapy espone il paziente a rischio di deficit di rame che può manifestarsi con anemia, neutropenia, neuropatie sensoriali o motorie e mielopatie.(121, 122)

Il problema più importante nei pazienti pediatrici affetti dalla malattia di Wilson è la volontaria sospensione della terapia, soprattutto durante l'adolescenza. Pertanto, risulta indispensabile uno stretto follow-up dei pazienti con incontri annuali e dialogo aperto con pazienti e genitori al fine di rinforzare la sorveglianza della famiglia e rafforzare l'aderenza del paziente. Se il trattamento viene sospeso, il rischio di progressione della malattia epatica diventa molto alto e può portare, dopo 1-12 mesi dalla sospensione, all'insufficienza epatica, quindi all'epatotrapianto o alla morte.(54)

Un altro problema emergente è relativo al monitoraggio a lungo termine del paziente ed è quello della transizione dal pediatra al medico generalista o allo specialista d'organo nell'età adulta. Difatti, grazie al miglioramento delle procedure diagnostiche e terapeutiche un numero crescente di pazienti raggiunge attualmente l'età adulta. La transizione pone una serie di problemi legati sia ad aspetti psicologici (si passa da un rapporto basato sull'interazione del medico con la coppia "inseparabile" paziente-genitore all'interazione "esclusiva" con il paziente) sia alla diversità delle specifiche competenze dei pediatri rispetto ai medici dell'età adulta. Questa diversità è correlabile al fatto che la malattia può avere espressioni diverse in età pediatrica ed in età adulta, per cui il paziente diagnosticato in età pediatrica (e quindi nella maggior parte dei casi con una epatopatia) ha più probabilità, in età adulta, di trovare neurologi piuttosto che epatologi disposti a seguirlo.

I.V Obiettivo della tesi

L'obiettivo delle ricerche esposte in questa tesi è quello di evidenziare i punti ancora dibattuti della gestione diagnostica e terapeutica della MW oltre che consentire un avanzamento nelle conoscenze della malattia e della sua gestione terapeutica. Nel secondo capitolo si provvederà ad illustrare le maggiori criticità dell'applicabilità delle linee guida al letto del paziente. Nei capitoli successivi, si analizzeranno aspetti chiave della gestione terapeutica della MW come il monitoraggio del paziente a lungo termine

e la necessità della dieta povera di rame. Il quinto capitolo mostrerà come l'approccio multidisciplinare consenta di chiarire aspetti ancora misconosciuti della storia a lungo termine della patologia come la capacità riproduttiva dei pazienti. Infine, si discuterà la possibilità di ottimizzare il dosaggio dei sali di zinco al fine di ottenere l'efficacia terapeutica minimizzando il rischio di tossicità d'organo a lungo termine a livello pancreatico ed il rischio paradossale di deficit di rame.

Gran parte della casistica seguita presso l'AOU Federico II è costituita da pazienti diagnosticati in età pediatrica con follow-up medio di oltre 15 anni che ben consente di analizzare la storia a lungo termine di questi pazienti. La necessità inoltre di transitare i bambini con MW in età adulta ha promosso la creazione nel corso degli anni di un Team multidisciplinare con specialisti dedicati a tale patologia rara. Ciò ha permesso di attivare dal 2017 il primo PDTA aziendale italiano del centro-sud per la MW. In seguito a tale attivazione, si è avuta la possibilità di ampliare la casistica, attualmente costituita da 80 pazienti (più della metà provenienti da altre regioni) con malattia di Wilson, la maggior parte dei quali in terapia con zinco, e di poter studiare in modo accurato una serie di problematiche che, sulla base di quanto disponibile in letteratura, restano ancora insolte.

Capitolo II

Dalle linee guida alla pratica clinica: applicabilità al letto del paziente

II.I Introduzione e scopo del lavoro

Linee guida specifiche per la diagnosi e la terapia della malattia di Wilson sono state pubblicate da autorevoli società internazionali quali l'American Association for the Study of Liver (AASLD) e l'European Association for the Study of Liver (EASL).(17, 42) L'European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) nel 2018 ha prodotto il primo Position Paper riguardante il management della MW di età pediatrica.(44) Successivamente, altre società si sono poi esposte come, ad esempio, l'Indian National Association for Study of the Liver (INASL) che ha pubblicato le sue Clinical Practice Guidelines nel 2019 in collaborazione con l'Indian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ISPGHAN) e la Movement Disorder Society of India (MDSI).(43)

Ciononostante, e sebbene linee guida siano disponibili da quasi 20 anni,(123) estremamente eterogenea è la gestione della patologia nel mondo come evidenziato da una survey internazionale condotta nel 2016 da Sturm et al. in cui viene chiaramente evidenziata l'ampia variabilità di approccio degli epatologi pediatri nel management del bambino affetto da MW.(124) In particolare, 111 clinici su 253 parteciparono alla survey di cui il 67% erano pediatri epatologi con oltre 10 anni di esperienza. Il 51% lavorava in Nord America ed il 40% in Europa. I maggiori punti di disaccordo tra i clinici, in merito all'aspetto diagnostico, riguardavano il cut-off della concentrazione di rame intraepatica richiesta per la diagnosi e l'indicazione all'esecuzione dell'analisi molecolare. Dal punto di vista terapeutico, il farmaco di prima scelta nel trattamento di pazienti diagnosticati per screening familiare era variabile così come quello per il trattamento di pazienti con disfunzione epatica.(124)

Scopo di questo lavoro era quindi quello di analizzare le differenti linee guida disponibili, le raccomandazioni fornite, l'applicabilità delle stesse alla pratica clinica quotidiana.

II.II Risultati e Discussione

Dall'analisi delle differenti linee guida emerge un consenso generale sulla necessità di scegliere il trattamento di prima linea nei pazienti diagnosticati con MW sulla base del quadro clinico d'esordio (presintomatico, epatopatico, neurologico).

In pazienti epatopatici sintomatici, cirrotici o con anomalie dell'INR è solitamente consigliato il trattamento chelante.(17, 42, 44) Per quanto riguarda la scelta del chelante da utilizzare tra D-penicillamina e trientina, sebbene sia riportata una pari efficacia con minori effetti collaterali determinati dalla trientina,(125, 126) ad oggi la trientina è considerata come alternativa terapeutica alla D-penicillamina in pazienti ad essa intolleranti.

In pazienti neurologici, le linee guida EASL consentono al clinico la scelta opzionale dello zinco come trattamento di prima linea, data la dimostrata efficacia di questo in alcune casistiche di pazienti adulti con sintomatologia neurologica.(127)

Per quanto riguarda i pazienti presintomatici o diagnosticati per screening, tutte le linee guida permettono la scelta tra chelante e sali di zinco come terapia di prima linea così come per il paziente in fase di mantenimento.(17, 42, 44) Le linee guida indiane forniscono raccomandazioni per lo più sovrapponibili a quelle EASL.(43)

L'indicazione alla terapia di combinazione è invece chiaramente posta solo nel position paper ESPGHAN per pazienti con cirrosi scompensata o insufficienza epatica acuta al fine di tentare di ridurre il ricorso all'epatotrapianto.(44)

Le principali criticità in merito all'applicazione di queste raccomandazioni ai pazienti con MW riguardano la distinzione tra paziente "presintomatico", "asintomatico" o "con lieve epatopatia", la terapia di combinazione, i criteri per il passaggio dalla fase di induzione alla terapia di mantenimento. Se nel Position Paper ESPGHAN è chiaramente specificato che il paziente presintomatico è colui che viene diagnosticato mediante screening familiare, poco chiari sono i criteri per definire il paziente asintomatico e quello con lieve epatopatia (steatosi e ipertransaminasemia senza sintomatologia

clinica).(44) Questi ultimi pazienti possono, infatti, essere considerati sia come affetti da esordio epatico e pertanto essere candidati al trattamento con chelante sia come asintomatici o affetti da lieve epatopatia e quindi essere candidati al trattamento con zinco. In merito poi alla terapia di combinazione, essa continua ad essere raccomandata in alcune linee guida nonostante ci siano dati contrastanti riguardo la sua efficacia. Una review sistematica del 2015 ne riportava, infatti, un tasso di efficacia complessivo di circa il 47% ed un più alto tasso di mortalità complessivo rispetto agli altri possibili trattamenti.(128) È da considerare anche il maggior rischio di scarsa aderenza al trattamento da parte del paziente nella prescrizione della terapia di combinazione rispetto alla monoterapia con chelante o sali di zinco. Ad oggi non ci sono studi di qualità metodologica tale da affermare la maggiore efficacia della terapia di combinazione rispetto alla monoterapia.

Non è chiaro, inoltre, quando considerare un paziente “decopperizzato” e quindi ignoti sono il timing e i criteri specifici per transitare il paziente alla fase di mantenimento della terapia con dosaggio ridotto di chelante o con sali di zinco.(126)

Ugualmente controversi sono anche i parametri di efficacia del trattamento da monitorare e la definizione stessa di paziente Responder e Non Responder, a differenza di quanto ad esempio avviene per altre condizioni morbose come l’epatite autoimmune dove sono indicati chiari parametri quantitativi per definire la risposta alla terapia. Nella MW, se è abbastanza agevole definire la risposta al trattamento per il paziente con epatopatia scompensata, è invece difficile valutarla in coloro che presentano alla diagnosi solo una lieve ipertransaminasemia e/o steatosi.

Infine, nelle diverse linee guida, si continua a far riferimento alla necessità di determinare la frazione di rame libero nel sangue, che ne rappresenta la quota realmente tossica per il paziente. Ciononostante, ad oggi non sono ampiamente disponibili in commercio delle metodiche accessibili per la determinazione standardizzata di questo parametro. La formula precedentemente citata nel 1° capitolo, “cupremia totale in $\mu\text{g/dL}$ – (ceruloplasmina in $\text{mg/dl} \times 3$)”, (17) ha dimostrato diversi limiti nella pratica clinica essendo dipendente dalla metodica utilizzata per il dosaggio della ceruloplasmina sierica. Inoltre, talvolta tale formula dà risultati negativi che appaiono di dubbia interpretazione. In teoria, il rame libero sarebbe da considerarsi un parametro utile per

il monitoraggio terapeutico dei pazienti con MW: livelli compresi tra 5-15 µg/dl si ritrovano in pazienti con adeguato controllo della malattia; valori <5 µg/dl sono indicativi di eccessiva deplezione di rame.(49, 126) Verosimilmente in futuro, con l'utilizzo di test diretti per tale determinazione, il suo utilizzo potrebbe divenire routinario.

Numerosi dubbi infine sussistono sul monitoraggio dei pazienti in terapia chelante. Difatti, molti pazienti complianti presentano anche dopo numerosi anni di trattamento valori di cupruria superiori a 500 µg/24ore in assenza di chiara evidenza clinica e biochimica di progressione della malattia.(129) Inoltre, il range 200-500 µg/24 ore non è stato validato da studi condotti su grossi campioni di pazienti con MW. Questa problematica insieme con la criticità relativa alla necessità di prescrivere una dieta povera di rame nei pazienti affetti da MW saranno discusse rispettivamente nei Capitoli III e IV di questo elaborato di tesi.

I risultati di questo lavoro sono stati pubblicati in forma di Letter to the Editor in Digestive and Liver Disease (Di Dato F, Iorio R. Wilson disease: Many guidelines but still many unsolved doubts. Dig Liver Dis. 2021 Jan;53(1):139-140).

Capitolo III

Il ruolo della cupruria nel monitoraggio dell'efficacia del trattamento con chelanti e dell'aderenza alla terapia: caso clinico esemplificativo

Nel secondo capitolo di questo elaborato di tesi abbiamo introdotto le criticità correlate al monitoraggio terapeutico dei pazienti in trattamento con chelante per MW. E' stato evidenziato in precedenza come, nei pazienti in terapia con D-penicillamina, sia universalmente accettato che la cupruria presenti valori elevati anche oltre 1000 μg nelle 24 ore nel primo anno di trattamento, per poi assestarsi in un range compreso tra 200 e 500 μg nelle 24 ore. Valori al di fuori di tale range sono ritenuti indicativi di mancata aderenza al trattamento o over-trattamento. In questo capitolo riportiamo il caso di un paziente diagnosticato in età pediatrica e trattato con D-penicillamina per circa 25 anni. Peculiarità del caso è il persistente riscontro di valori di cupruria superiori a 500 μg nelle 24 ore come da mancata aderenza alla terapia. Tuttavia, la riduzione dei valori di ceruloplasmina negli anni e l'assenza di dati clinici, laboratoristici e di imaging di progressione di malattia sono evidenza di una efficace terapia farmacologica in atto. Le condizioni cliniche estremamente favorevoli del paziente su un follow-up di circa 25 anni suggeriscono la necessità di rivisitare gli intervalli terapeutici indicati dalle linee guida internazionali e di programmare studi multicentrici a tal fine progettati. Le recenti indicazioni fornite dall'AASLD nell'Agosto 2022, in parte rimodulano la rigidità di questo target terapeutico di cupruria, affermando la possibilità di sospettare la non aderenza in pazienti con valori di cupruria $>500 \mu\text{g}/24\text{h}$, ma che in precedenza mostravano livelli di rame urinario nel range desiderato.(21)

Il lavoro riportato in questo capitolo è stato pubblicato sulla rivista Biochimica Clinica nel 2020 (Maria Flavia Starita, Fabiola Di Dato, Margherita Matarazzo, Raffaele Iorio, Marcella Savoia. E' tempo di ridefinire gli intervalli di riferimento e terapeutici della cupruria nella malattia di Wilson? Biochimica Clinica, 2020, 44(3), pp. E23–E26).

È tempo di ridefinire gli intervalli di riferimento e terapeutici della cupruria nella malattia di Wilson?

Maria Flavia Starita¹, Fabiola Di Dato², Margherita Matarazzo³, Raffaele Iorio^{2,4}, Marcella Savoia^{1,5}

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli

²Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, sezione Pediatria, Università Federico II, Napoli

³Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, sezione Medicina Interna, Università Federico II, Napoli

⁴U.O.S. di Epatologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II, Napoli

⁵D.A.I. Medicina di Laboratorio e Trasfusionale, Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II, Napoli

ABSTRACT

Is it time to redefine cupruria reference and therapeutic intervals in Wilson's Disease?

Wilson's Disease (WD) is an autosomal recessive genetic disease caused by mutations to the copper-transporting gene *ATP7B*. WD leads to hepatic copper retention with subsequently clinical manifestations in different organs. The biochemical diagnostic approach includes measurement of serum ceruloplasmin levels and 24-hour urinary copper excretion (uCu/24h). WD patients are generally treated with D-penicillamine and cupruria is necessary to confirm the efficacy of maintenance treatment and the patient's adherence to therapy. A 30-year-old man was diagnosed with WD at the age of 5 and, since then, was treated with D-penicillamine. In this patient the uCu/24h values never fell within the range recommended by International Guidelines, but no clinical or subclinical progressions of the disease were found. The information derived from this single WD patient, monitored by serial clinical and laboratory checks for more than twenty years, may be useful for a better long-term management of WD, although we suggest that multicenter studies to re-define cupruria reference and therapeutic intervals are needed.

CASO CLINICO

Un paziente maschio di 5 anni giunge nel mese di dicembre del 1994 presso l'U.O.S. di Epatologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli per riscontro di elevati livelli di: aspartato aminotransferasi (AST), 130 U/L (v.r. <34); alanina aminotransferasi (ALT), 395 U/L (v.r. <55); gamma glutamil transferasi (GGT), 187 U/L (i.r. 12-64). Tali indagini erano state richieste perché il paziente lamentava dolore addominale e sintomi aspecifici quali dispepsia.

Vengono escluse le principali cause di epatopatia colestatica anitterica in età pediatrica (infezioni, celiachia, epatite autoimmune, patologie biliari, epatotossicità da farmaci). Nell'ambito delle malattie genetiche-metaboliche che si manifestano con ipertransaminasemia, si sono valutati i biomarcatori di

primo livello della malattia di Wilson (MW) (1). Presso il D.A.I. di Medicina di Laboratorio vengono eseguite: la misura nefelometrica dei livelli sierici di ceruloplasmina (Cp), 0,16 g/L (i.r. 0,2-0,6), con reagenti e su strumentazione BNP-ProSpec (Siemens Healthcare Diagnostics); la determinazione, mediante spettroscopia di assorbimento atomico con strumentazione PinAAcle 900T (PerkinElmer), dei livelli di rame urinario su campione delle 24h (uCu/24h), 270 µg/24h (v.r. <40) e del rame sierico (sCu), 0,7 µg/L (i.r. 0,69-1,22).

Essendo questi risultati suggestivi di MW (1) si era reso necessario eseguire al piccolo paziente una biopsia epatica che ha mostrato: struttura lobulo laminare conservata; infiltrati focali intralobulari con necrosi puntiforme; iperplasia delle cellule del Kupffer; steatosi del 75%; livelli di rame intraepatico, misurati in spettroscopia di assorbimento atomico (2), pari a 1129 µg/g di tessuto secco (v.r. <50). Infine, l'analisi

Corrispondenza a: Marcella Savoia, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Via Sergio Pansini 5, 80131 Napoli, Tel 0817463842, E-mail marcella.savoia@unina.it

Ricevuto: 12.03.2020

Revisionato: 16.03.2020

Accettato: 16.04.2020

Publicato on-line: 09.07.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.041

molecolare, appena disponibile, attraverso l'identificazione della mutazione H1069Q in omozigosi, ha permesso di confermare la diagnosi di MW.

Il paziente intraprende nel marzo 1995 trattamento con chelante del rame, D-penicillamina al dosaggio di 20 mg/Kg/die, somministrato in due dosi lontano dai pasti (3). Vengono monitorati i parametri AST, ALT, GGT e uCu/24h ogni tre mesi fino a normalizzazione degli indici di citolisi epatica e, annualmente, dopo avere verificato la stabilizzazione della malattia. I livelli di transaminasi e GGT si sono prontamente normalizzati (Figura 1), con i seguenti valori medi registrati dal 1996 al 2019: AST 26 U/L (intervallo 14-52); ALT 38 U/L (intervallo 20-96); GGT 23 U/L (intervallo 16-42).

Durante il monitoraggio si assiste ad una progressiva diminuzione dei livelli di Cp, da 0,16 g/L alla diagnosi a valori di 0,07 g/L nel 2019. Sebbene il trattamento con chelanti nella fase di mantenimento sia considerato efficace per valori di uCu/24h (misurati in spettroscopia di assorbimento atomico) compresi tra i 200-500 µg/24h, da raggiungere già dopo il primo anno di terapia (1), durante i 25 anni circa di monitoraggio i livelli misurati, (valore medio: 951 µg/24h, intervallo 518-1536), non sono mai rientrati nell'intervallo atteso. Il paziente presenta però un decorso clinico estremamente favorevole: assenza di epatosplenomegalia e di altri segni di epatopatia; normalità della crescita e dello sviluppo psico-motorio; assenza di sintomatologia neurologica e dell'anello di Kayser-Fleischer; assenza di sviluppo di ipertensione portale e di ipersplenismo. All'ecografia persiste solo una steatosi epatica di grado lieve-moderato; gli enzimi epatici, gli indici di sintesi delle proteine e l'esame emocromocitometrico risultano sempre nella norma. Durante il monitoraggio si effettua anche una risonanza magnetica nucleare (RMN) dell'encefalo per escludere patologie cerebrali subcliniche, con esito negativo, confermando l'assenza di alterazioni cerebrali significative.

DISCUSSIONE

La MW è un disordine genetico del metabolismo del rame a trasmissione autosomica recessiva, con una prevalenza stimata nel mondo di circa 1:30 000 - 50 000 individui (4).

Il gene responsabile della malattia, localizzato sul cromosoma 13q14, codifica per una proteina di membrana ATP7B, appartenente alla famiglia delle P-type ATPase, espressa primariamente nel fegato e il cui ruolo è quello di regolare il trasporto del rame (5).

In presenza di livelli fisiologici di rame, la proteina ATP7B, necessaria per facilitare l'acquisizione del rame da parte di proteine quali la Cp, è localizzata a livello del Trans Golgi Network (TGN). In condizioni di aumento della concentrazione di rame intracellulare, a livello dell'epatocita avviene il rilascio dell'ATP7B, trasferita in forma vescicolare dal TGN al polo canalicolare, sito di escrezione del rame (6).

Mutazioni del gene *ATP7B* inducono: una diminuzione della sintesi della Cp; ridotta escrezione del rame nella bile; accumulo del rame a livello epatico e in altri organi (in particolare cervello, cornea e tubuli renali).

A causa della molteplicità degli organi colpiti, la MW presenta un fenotipo molto variabile, dipendente anche dall'età di insorgenza della malattia, che si manifesta solitamente nelle prime decadi di vita, prevalentemente tra i 5 ed i 35 anni (7). Nei primi anni di vita, la MW si presenta spesso con un quadro di epatopatia, mentre con l'avanzare degli anni si osserva maggiormente un quadro neuropsichiatrico. L'eterogeneità dell'espressione clinica rende difficile la diagnosi soprattutto in età pediatrica, e per tale motivo è necessario mantenere alto l'indice di sospetto. In Italia, la maggior parte dei pazienti affetti da MW è identificata in seguito al riscontro occasionale di aumento delle transaminasi, dovuto alla consuetudine del nostro paese di richiedere la loro determinazione anche in assenza di specifiche condizioni cliniche (6).

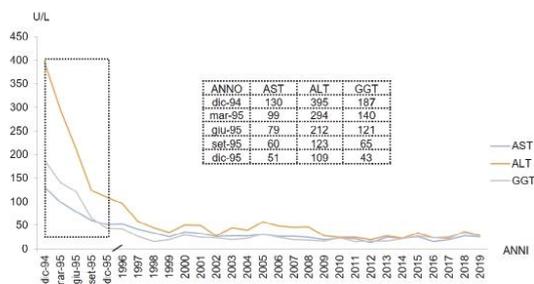


Figura 1
Livelli di AST, ALT e GGT registrati da dicembre 1994 a ottobre 2019.
Nel riquadro sono riportati i valori osservati ogni tre mesi nel primo anno (1994-1995).
↑, inizio trattamento con D-penicillamina, dosaggio 20 mg/Kg/gg

Diagnosticare precocemente la MW è di fondamentale importanza in quanto consente di trattare farmacologicamente i pazienti prima dell'insorgenza di gravi danni epatici e neurologici. Data la difficoltà nel formulare una diagnosi precoce, per la mancanza di singoli elementi clinici e/o biochimici che consentano una diagnosi certa di MW, fatta eccezione per l'indagine molecolare di secondo livello, è stato proposto da Ferenci et al. uno score diagnostico che include criteri clinici, biochimici, istologici e molecolari (8).

Un esame di primo livello è rappresentato dalla misura della Cp. Sebbene la misura nefelometrica comunemente impiegata non sia in grado di discriminare la Cp (forma matura legata al rame) dall'apoCp (forma non legante il rame), i livelli risultano comunque ridotti nella MW, a causa dell'alterata biosintesi della Cp e della breve emivita della apoCp, circa 5 ore contro i 5,5 giorni della Cp (1). Altro esame diagnostico di primo livello è uCu/24h, dove il rame urinario riflette la quota di rame libero circolante: una cupruria >40 µg/24h è considerata suggestiva di MW (6).

Nell'iter diagnostico viene consigliata la determinazione del sCu e quella del rame epatico, se quest'ultima è >250 µg/g di peso secco, è altamente indicativa di MW (4). L'analisi molecolare del gene *ATP7B* rappresenta comunque il test dirimente.

I farmaci ad oggi impiegati per il trattamento dei pazienti MW sono i chelanti del rame, come la D-penicillamina, che promuove l'escrezione del rame urinario o i sali di zinco che inducono le metallotioneine epatiche ed intestinali, inibendo l'assorbimento del rame e favorendone l'eliminazione con le feci.

Il trattamento con D-penicillamina viene considerato efficace quando la cupruria, già dopo il primo anno di terapia, risulta compresa tra 200-500 µg/24h; livelli inferiori o superiori sono indicativi rispettivamente di una scarsa compliance o di eccessivo trattamento (9).

Il caso clinico in esame presentava alla diagnosi, effettuata all'età di 5 anni, incrementi di AST, ALT, GGT ed epatomegalia, segnali sufficienti a far sorgere al clinico il sospetto di MW. Gli esami specifici di primo livello, Cp e uCu/24h, risultavano francamente alterati, mentre il sCu era nella norma e la conseguente biopsia epatica mostrava incrementi del rame epatico. La diagnosi è stata poi confermata dal test genetico che ha identificato una mutazione in omozigosi di H1069Q, la più comune nel mondo occidentale, con frequenza allelica del 13-17% nella popolazione italiana (10).

Il paziente, trattato con D-penicillamina, ha mostrato livelli di Cp tendenti nel tempo a diminuire progressivamente. Tale decremento potrebbe essere causato da una eccessiva deplezione in circolo del rame, con conseguente aumento dell'apoCp rapidamente degradabile, e diminuzione del sCu, valore medio 0,4 mg/L (intervallo 0,11-0,71). Durante il trattamento sono stati osservati valori di uCu/24h sempre al di sopra dell'intervallo atteso (200-500 µg/24h), con livelli anche particolarmente elevati, e un valore medio 951 µg/24h (intervallo 518-1536). Tale

risposta al farmaco ha indotto a prendere in considerazione un passaggio alla terapia con sali di zinco che però il paziente ha rifiutato. È stato pertanto proseguito il trattamento con D-penicillamina (stabilizzato nel tempo alla dose di 1200 mg/die) che, pur non avendo consentito il raggiungimento dei livelli attesi di uCu/24h, aveva portato ad una pronta normalizzazione di AST, ALT e GGT e alla mancata progressione clinica della malattia. Durante il monitoraggio non sono stati osservati innalzamenti dei livelli delle transaminasi e l'RMN dell'encefalo, eseguita nel 2019, non ha mostrato alterazioni.

Il caso presentato ha dimostrato, a nostra conoscenza per la prima volta, che è possibile una evoluzione favorevole della MW, sotto terapia con D-penicillamina, anche quando i livelli di uCu/24h risultano superiori a quelli indicati dalle linee-guida internazionali. Pur trattandosi di un singolo paziente, il monitoraggio più che ventennale con valutazione periodica delle possibili complicanze epatiche, neurologiche e psichiatriche, dà forza alla nostra osservazione e può essere utile per chi gestisce la terapia nel lungo termine, sebbene studi multicentrici siano auspicabili al fine di rivisitare gli intervalli di escrezione urinaria del rame, sia di riferimento che di valutazione dell'efficacia della terapia.

Infine, si sottolinea l'importanza della stretta collaborazione tra clinica e laboratorio e la necessità di monitorare costantemente, sia dal punto di vista clinico che laboratoristico, i pazienti affetti da MW. Per far fronte a questa esigenza presso l'AOU Federico II di Napoli è attivo dal 2017 il Percorso Diagnostico Terapeutico Assistenziale (PDTA) dedicato alla MW, costituito da un gruppo multidisciplinare clinico e laboratoristico in grado di prendere globalmente in cura il paziente affetto da MW.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Mohr I, Weiss KH. Biochemical markers for the diagnosis and monitoring of Wilson disease. *Clin Biochem* 2019;40:59-77.
- Duncan A, Christopher FH, Catchpole A et al. Is the measurement of copper and iron in liver biopsies reliable? Results from a pilot external quality assurance scheme. *J Trace Elem Med Bio* 2019;52:288-92.
- European Association for the Study of the Liver (EASL). Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol* 2012;56:671-85.
- Stättermayer AF, Entenmann A, Gschwanter M et al. The dilemma to diagnose Wilson disease by genetic testing alone. *Eur J Clin Invest*. 2019;49:e13147.
- Medici V, LaSalle JM. Genetics and epigenetic factors of Wilson disease. *Ann Transl Med* 2019;7 (Suppl 2):S58.
- Ranucci G, Zappu A, Lepori MB et al. Malattia di Wilson: ancora una sfida diagnostica. *Prospettive in Pediatria* 2012;42:12-20.

7. Boga S, Ala A, Schilsky ML. Hepatic features of Wilson disease. *Handb Clin Neurol* 2017;142:91-9.
8. Ferenci P, Caca K, Loudianos G et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Inter* 2003;23:139-42.
9. Rodriguez-Castro KI, Hevia-Urrutia FJ, Stumilo GC. Wilson's disease: A review of what we have learned. *World J Hepatol* 2015;7:2859-70.
10. Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet* 2006;120:151-9.

Capitolo IV

Ruolo del ridotto intake di rame nel trattamento del paziente con malattia di Wilson

IV.I Introduzione

Il controllo dell'introito alimentare di rame ha avuto un ruolo nel trattamento della malattia di Wilson sin dal 1960 quando Scheinberg e Sternlieb provarono a trattare la patologia tramite l'associazione di una dieta povera di rame e D-penicillamina, nel duplice tentativo di eliminare il rame già depositatosi nell'organismo ed evitarne un ulteriore accumulo. Sebbene non ci siano chiare evidenze che la dieta influenzi l'età di esordio o la severità della malattia, ad oggi diverse linee guida riportano la raccomandazione di evitare assunzione di alimenti ed acqua ricchi in rame nei pazienti in trattamento. Tali raccomandazioni sono tuttavia basate su livello di evidenza IC per l'AASLD, IIB per l'EASL.(17, 42) Le più recenti linee guida indiane ed il Position Paper ESPGHAN aprono la strada alla possibilità di prescrivere una restrizione alimentare solo per i cibi a contenuto di rame molto alto in particolare nel primo anno di trattamento ed in pazienti in terapia con chelanti.(43, 44)

Sebbene la restrizione dietetica di rame rimanga uno dei capisaldi del trattamento della patologia, non vi sono infatti molte evidenze scientifiche riguardo l'impatto del rame alimentare sulla salute dei pazienti con malattia di Wilson. Recentemente è maggiore l'attenzione all'argomento anche per la dimostrazione di un precoce esordio della malattia e più veloce progressione in modelli murini nutriti con dieta ad elevato contenuto calorico. Tuttavia, sebbene due recenti review siano state pubblicate sull'argomento, stentano ad essere prodotte nuove ricerche in merito.(130, 131)

Inoltre, la restrizione dell'introito alimentare di rame come terapia per la MW è stata elaborata in un momento storico in cui l'unico farmaco esistente per il trattamento della patologia era la D-penicillamina. Con l'avvento di altre terapie, in particolare quella con sali di zinco che impediscono l'assorbimento del rame, potrebbe non essere necessario limitare l'assunzione di alimenti ricchi di rame nella dieta di questi pazienti.

L'introito giornaliero raccomandato di rame è di circa 1.3 mg nelle donne e 1.6 mg negli uomini. Se è vero che cioccolato, frutta secca, legumi, farine integrali sono naturalmente più ricchi di questo metallo di altri alimenti, è altresì vero che per eccedere l'introito consigliato di rame secondo i LARN, bisognerebbe consumare quotidianamente quantità estremamente elevate di tali alimenti. È stato dimostrato infatti che l'assorbimento intestinale di rame, meccanismo conservato nei pazienti con MW, è inversamente proporzionale al metallo introdotto con gli alimenti. Diverse invece sono le considerazioni per i crostacei, i mitili ed il fegato di animali che contengono rispettivamente 36 mg/kg, 15 mg/kg e 157 mg/kg di rame e per cui è sicuramente indicato un consumo sporadico nei pazienti con MW.

Le due review recentemente pubblicate concludono affermando che l'eliminazione del rame dalla dieta è estremamente difficile considerata la sua ubiquarietà. Inoltre, tale provvedimento potrebbe non essere necessario data l'assenza di chiare evidenze a favore, ancor più in pazienti con malattia stabile e aderenti al trattamento.(130, 131)

L'obiettivo di questo studio pilota è stato quello di analizzare l'introito quotidiano di rame in pazienti in trattamento con sali di zinco, a dieta libera eccetto che per cibi ad elevato contenuto di rame quali fegato, mitili e crostacei, e determinare l'impatto dell'introito alimentare quotidiano del metallo sugli enzimi epatici ed i parametri del metabolismo del rame.

IV.II Pazienti e metodi

Lo studio è stato condotto su una casistica di pazienti affetti da MW diagnosticata in età pediatrica ed in trattamento da lungo tempo. Criteri di inclusione erano: diagnosi confermata con analisi molecolare del gene *ATP7B* o determinazione del rame intraepatico; diagnosi posta in età pediatrica; monoterapia con zinco in atto. Criteri di esclusione erano: mancata disponibilità di dati relativi al metabolismo del rame e al trattamento, oltre che clinici alla diagnosi e nel corso del follow-up; trattamento in atto da meno di un anno.

L'introito quotidiano di rame era valutato mediante l'analisi di un diario alimentare dettagliato compilato dal paziente per 3 giorni consecutivi in cui ogni tipo di alimento e bevanda assunti venivano riportati con le relative quantità consumate (**Figura 1**). La

intake di rame” (**High Copper Intake group, HCI-group**) se l’introito medio era rispettivamente inferiore oppure superiore alla soglia minima dell’RDA per età.

Age Group	Males/Females-Lower Intake Level for Copper ($\mu\text{g/day}$)	Males/Females-Upper Intake Level for Copper ($\mu\text{g/day}$)
0 - 6 months	200 (AI)	Not possible to establish*
7 - 12 months	220 (AI)	Not possible to establish*
1 - 3 years	340	1000
4 - 8 years	440	3000
9 - 13 years	700	5000
14 - 18 years	890	8000
19 years and older	900	10,000
All ages	-	-
All ages	-	-

Figura 2. Fabbisogno giornaliero di rame raccomandato (Recommended Daily Allowance) per fasce d’età nella popolazione generale.(132)

Per ogni paziente venivano inoltre raccolti al tempo della diagnosi e al tempo della compilazione del diario i seguenti dati: sesso, età alla diagnosi, età all’osservazione, modalità d’esordio, terapia praticata durante il follow up, AST, ALT, GGT, cupruria, cupremia, zincuria, zinchemia.

La compliance al trattamento era valutata sia sulla base dei dati anamnestici riguardanti le modalità di assunzione del farmaco (rispetto della dose prescritta e del numero di dosi giornaliere, adeguato intervallo tra assunzione del farmaco e pasti) sia in base ai livelli di cupruria ($<75 \mu\text{g}/24$), zincuria ($>2000 \mu\text{g}/24\text{h}$) e zinchemia ($>150 \mu\text{g}/\text{dl}$).

La risposta al trattamento veniva valutata sulla base dei parametri del metabolismo del rame e degli indici di citolisi epatica. Si definiva **Responder** il paziente con ALT inferiore a 1.5 volte il limite alto della norma (ULN) per età e con valori di cupruria nel range atteso per la terapia in atto ($<75 \mu\text{g}/24$ ore per i pazienti in terapia con zinco); **Low-Responder** il paziente con valori di ALT >1.5 ULN e/o cupruria $>75 \mu\text{g}/24$ ore; **Non-Responder** il paziente con ALT >1.5 ULN e cupruria $>75 \mu\text{g}/24$ ore.

L'analisi statistica veniva effettuata con Software SPSS 28.0 e GraphPad Prism 9 utilizzando T-Student, test del Chi quadro o esatto di Fisher, Mann-Whitney U Test e correlazioni lineari. Il p-value era considerato significativo per valori inferiori 0.05.

IV.III Risultati

Venivano arruolati 20 pazienti, 12 (54.5%) maschi; di questi 9 erano in età pediatrica. L'età media al momento dello studio era di 22.8 ± 10.2 anni, il tempo medio di follow-up 15.9 ± 10.3 anni. 14 (70%) pazienti erano Responder al trattamento; dei 6 non responder, 1 (14.3%) paziente risultava non aderente alla terapia prescritta. L'intake medio giornaliero di rame dell'intera popolazione oggetto di studio era 0.69 ± 0.29 mg/die. Tutti i pazienti mostravano un intake medio giornaliero di rame inferiore al limite superiore dell'RDA per età; inoltre, pur essendo tutti a dieta libera, solo in 7 pazienti si registrava un intake adeguato per età (HCI-group). Quando distinti in base al basso (LCI-group) o alto (HCI-group) intake di rame, i pazienti non mostravano differenze statisticamente significative in termini di età all'osservazione e tempo di follow-up, indici di citolisi epatica e colestasi, parametri del metabolismo di rame e zinco (**Tabella 2**). Per evitare un eventuale bias correlato all'incompleta risposta al trattamento, l'analisi comparativa tra i due gruppi sopra definiti veniva effettuata anche includendo i soli pazienti Responder alla terapia. Anche in questo caso, l'unica differenza statisticamente significativa era relativa alla quantità di rame introdotta con la dieta (**Tabella 3**). Quando venivano comparati i Responder ed i Low-Responder per l'intake medio giornaliero di rame, nessuna differenza statisticamente significativa veniva rilevata (rispettivamente 0.76 ± 0.31 vs 0.54 ± 0.15 mg/die; $p=0.12$). Nessuna associazione veniva inoltre evidenziata tra risposta alla terapia ed intake di rame ($p=0.354$) (**Figura 3**).

	LCI-group	HCI-group	p-value
Età all'osservazione (anni)	21.08±9.1	26±12.03	0.315
Follow-up (anni)	14.96±8.93	17.68±13.16	0.588
Intake di rame (mg/die)	0.54±0.18	0.98±0.22	<0.001
AST (IU/l)	31.46±11.89	32.71±17.72	0.852
ALT (IU/l)	53.08±36.47	53.57±58.61	0.982
GGT (IU/l)	29.92±25.87	26.43±15.40	0.749
Cupruria (µg/24h)	66.1±59.57	43.93±21.58	0.359
Zincuria (µg/24h)	4473.40±2649.04	2854.75±1996.42	0.176
Cupremia (µg/dl)	18.94±10.54	31.41±27.56	0.159
Zinchemia (µg/dl)	230.7±62.09	274.06±37.94	0.139

Tabella 2. Parametri clinici e laboratoristici di 20 pazienti con malattia di Wilson, distinti sulla base dell'intake medio giornaliero di rame. LCI: Low Copper Intake; HCI: High Copper Intake.

	LCI-group	HCI-group	p-value
Età all'osservazione (anni)	20.62±10.61	27.5±12.44	0.286
Follow-up (anni)	13.98±10.45	19.54±13.36	0.398
Intake di rame (mg/die)	0.56±0.21	1.02±0.20	0.001
AST (IU/l)	26.38±7.61	27.17±10.87	0.875
ALT (IU/l)	36.88±15.72	31.83±12.35	0.529
GGT (IU/l)	17.50±5.42	24.83±16.23	0.251
Cupruria (µg/24h)	28.60±21.61	45.73±23.06	0.179
Zincuria (µg/24h)	4328.37±2743.85	2663.22±2115.35	0.241
Cupremia (µg/dl)	17.50±9.43	34.98±28.36	0.126
Zinchemia (µg/dl)	223.61±47.45	274.07±37.94	0.061

Tabella 3. Parametri clinici e laboratoristici di 14 pazienti con malattia di Wilson Responder al trattamento, distinti sulla base dell'intake medio giornaliero di rame. LCI: Low Copper Intake; HCI: High Copper Intake.

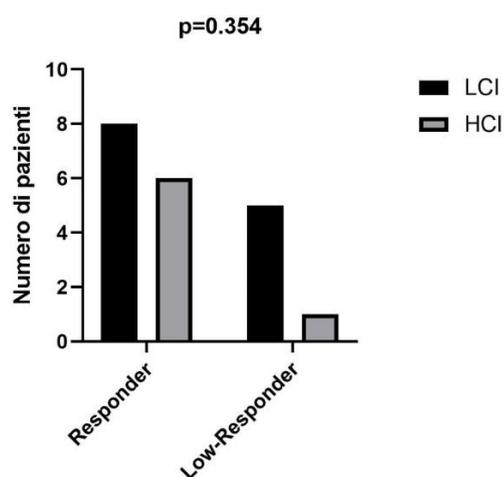


Figura 3. 20 pazienti con malattia di Wilson, 14 Responder e 6 Low-Responder, suddivisi per intake di rame giornaliero.

Nessuna correlazione statisticamente significativa veniva evidenziata tra l'intake medio di rame e cupruria (**Figura 4**), cupremia (**Figura 5**), zincuria, zinchemia, AST, ALT (**Figura 6**) e GGT.

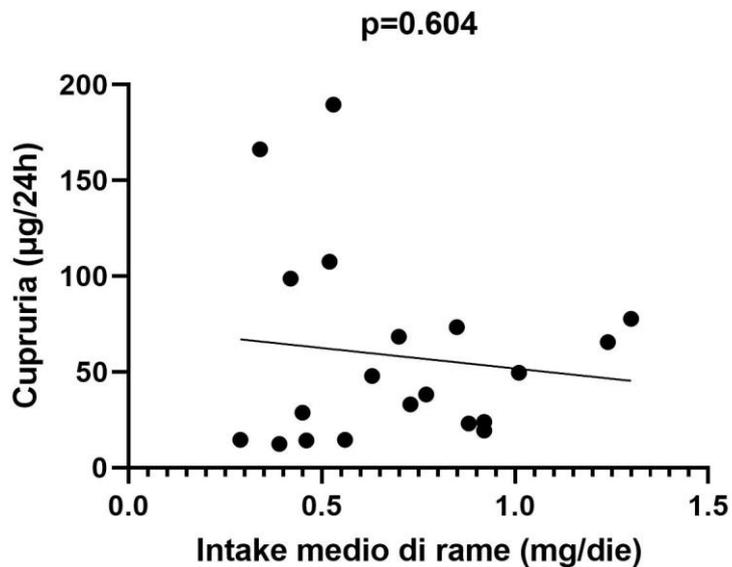


Figura 4. Correlazione tra intake medio giornaliero di rame e cupruria delle 24 ore in 20 pazienti con malattia di Wilson.

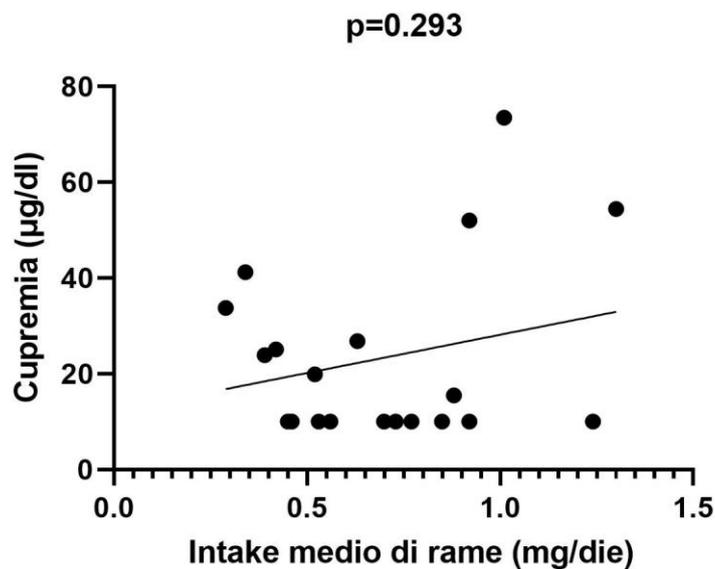


Figura 5. Correlazione tra intake medio giornaliero di rame e cupremia in 20 pazienti con malattia di Wilson.

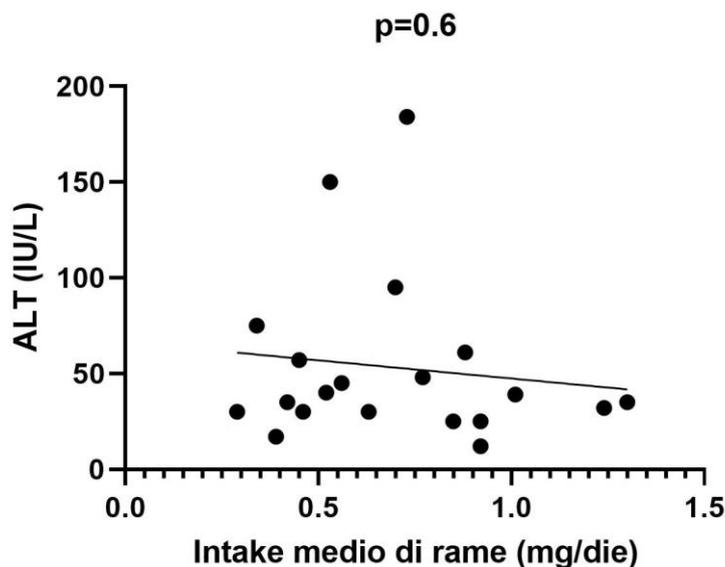


Figura 6. Correlazione tra intake medio giornaliero di rame e valori sierici di ALT in 20 pazienti con malattia di Wilson.

IV.IV Discussione

Il rame è un oligoelemento fondamentale per le funzioni metaboliche dell'organismo ed il suo assorbimento è dunque strettamente controllato tramite un meccanismo adattativo. Dal momento che la MW è causata da un accumulo di rame nell'organismo, da sempre si è considerata la riduzione dell'apporto di rame con la dieta un elemento fondamentale per il suo trattamento. Tuttavia, la prescrizione di una dieta a basso contenuto di rame, ancora oggi consigliata dalle linee guida europee ed americane, in particolar modo nel primo anno di trattamento, non si basa su evidenze scientifiche forti quanto bensì sull'opinione di esperti.(17, 21, 42) Le linee guida indiane in parte hanno posto il dubbio sulla raccomandazione seppur non fornendone poi una specifica.(43) Il position paper dell'ESPGHAN sul management dei pazienti pediatrici recentemente pubblicato, è stato l'unico che ha modificato in parte tale atteggiamento, raccomandando una dieta povera di rame fino a normalizzazione degli indici di citolisi epatica e in pazienti in trattamento con chelante.(44) Se infatti da un lato il ristretto apporto di rame potrebbe apparire utile nei pazienti in trattamento con chelante, in particolare nel primo anno di trattamento al fine di favorire la mobilizzazione del metallo accumulato, dall'altro il meccanismo d'azione dello zinco indurrebbe a pensare ad una inutilità di tale provvedimento. L'induzione delle metallotioneine a livello intestinale con il blocco dell'assorbimento

del metallo e l'aumentata escrezione a livello fecale, infatti, non giustificerebbe la necessità di ridurre l'introito del metallo con la dieta. Ciò nonostante, tali congetture non trovano conferma in letteratura per la quasi totale assenza di dati a riguardo. Tali considerazioni sono dunque state alla base del presente studio, volto principalmente ad indagare il reale pericolo rappresentato dal rame assunto con la dieta nei pazienti affetti da malattia di Wilson diagnosticata in età pediatrica e trattati con sali di zinco. Seppur dunque con i limiti di una piccola casistica e del calcolo dell'apporto quotidiano di rame effettuato mediante un recall alimentare di soli tre giorni, lo studio pilota qui descritto fornisce primi risultati scientifici sull'argomento e apre la strada a future ricerche nel campo. Un primo dato che emerge analizzando la coorte di pazienti inclusa è proprio l'assunzione di ridotte quantità di rame nonostante la prescrizione di una dieta libera fatta eccezione per fegato, mitili e crostacei. E' possibile che in tale riscontro giochi un ruolo l'informazione scientifica contrastante accessibile ai pazienti tramite la rete internet oltre che un condizionamento psicologico intrinseco che porti il paziente ad eliminare dall'alimentazione ciò che è causa della sua stessa patologia. Non è da dimenticare inoltre il lungo follow-up della casistica studiata che potrebbe rappresentare un ulteriore motivo di tale risultato. Questi pazienti infatti hanno ricevuto diagnosi di malattia circa 20 anni fa, quando probabilmente all'inizio del loro percorso terapeutico venivano fornite molteplici raccomandazioni sugli alimenti da non assumere.

Risultato cruciale di questo progetto è che nessuna correlazione è stata rilevata tra l'introito medio di rame quotidiano e i valori dei parametri del metabolismo del rame e degli enzimi epatici. Di particolare interesse risulta l'analisi di correlazione tra intake di rame e cupruria. Quest'ultima è infatti il parametro più indicativo del metabolismo del rame nell'organismo in questi pazienti e la non significatività del test conferma verosimilmente il blocco dell'assorbimento intestinale del rame ad opera dello zinco, indipendente dalla quantità assunta del primo metallo. Altrettanto importante è poi l'analisi di correlazione tra l'intake di rame e l'ALT dei nostri pazienti. L'ALT, essendo un indice di citolisi altamente epatospecifico, risulta essere un ottimo indicatore dello stato di salute degli epatociti. Anche in questo caso la correlazione risulta statisticamente non significativa, di fatto confutando un'associazione tra l'intake di rame e il danno epatico nella nostra coorte di pazienti. Inoltre, nessuna significativa differenza in termini

di cupremia, cupruria, zinchemia, zincuria, AST, ALT e GGT è stata riscontrata nei pazienti con alto e basso introito alimentare del metallo. Allo stesso modo Responder e Low Responder non differivano per quel che riguarda l'assunzione di rame con la dieta. Tali risultati supportano dunque l'ipotesi che il rame alimentare non abbia alcun impatto sulla salute dei pazienti con MW in trattamento con zinco da almeno un anno. Questo studio è dunque tra i primi a fornire risultati scientificamente validi, che consentano di prescrivere una dieta libera ai pazienti wilsoniani in terapia con zinco, come solo recentemente per la prima volta raccomandato dalle linee guida ESPGHAN. In conclusione, è possibile quindi affermare che il rame assunto con la dieta non pare avere un impatto sull'efficacia terapeutica ed il bilancio del rame nei pazienti con MW in terapia di mantenimento con sali di zinco. Ulteriori studi sono necessari a confermare tali risultati preliminari al fine di ottenere sempre più evidenze scientifiche che possano indurre a non considerare più la dieta come un presidio terapeutico per questa categoria di pazienti con notevoli risvolti positivi anche sulla loro qualità di vita.

I risultati di questo studio sono stati presentati in forma di abstract accettato come poster al 6th World Congress of Pediatric Gastroenterology Hepatology And Nutrition (Fabiola Di Dato, Ida De Micco, Margherita Matarazzo, Anna De Rosa, Maria Rosaria Serra, Maria Immacolata Spagnuolo, Raffaele Iorio. Wilson Disease patients on zinc therapy: uselessness of the low copper diet. JPGN May 2021;72(S1):921)

Capitolo V

Salute riproduttiva nei pazienti con malattia di Wilson

V.I Introduzione

Come precedentemente descritto, l'aspettativa di vita dei pazienti con MW precocemente diagnosticati e adeguatamente trattati è sovrapponibile alla popolazione generale.(18) Ciò ha determinato una maggiore attenzione alla qualità di vita di questi pazienti. E' noto che la MW puo' causare disordini ormonali in entrambi i sessi ed in particolare disfunzioni ovulatorie e amenorrea nelle donne, e impotenza e ginecomastia negli uomini.(133) L'eziologia di queste alterazioni non è chiaramente definita, potendo essere da ascrivere sia alla disfunzione epatica, sia all'accumulo del rame negli organi coinvolti. Kaushansky et al. nel 1987 infatti, descrissero come le disfunzioni ovulatorie nelle donne potessero essere da attribuire all'accumulo del metallo nelle ovaie.(134) Nel sesso femminile sono riportati sia casi di pazienti con gravidanze spontanee, sia casi in cui è stata necessaria una stimolazione con clomifene per indurre il concepimento.(135) Ancor meno indagata è l'abilità procreativa nel maschio: in un lavoro è riportato un singolo caso di impotenza in una coorte di 27 pazienti, mentre in un altro viene descritto un caso di oligo-azeno-teratozoospermia peggiorata durante trattamento con penicillamina.(133, 136)

Dalla letteratura si evince che le tre aree che richiedono più attenzione nella gestione della paziente gravida con malattia di Wilson sono la prevenzione degli aborti spontanei, il controllo della malattia materna e la minimizzazione della teratogenicità indotta da farmaci.

La MW, se non trattata, determina una elevata frequenza di aborti spontanei e ricorrenti nelle donne gravide.(32, 137) Recentamente su Hepatology è stato riportato come donne affette da MW abbiano un più alto tasso di aborti rispetto alla popolazione generale; esso inoltre era maggiore nelle donne non trattate (41%) rispetto a quelle in terapia con chelante (17%) o zinco (10%).(138) Il meccanismo patogenetico alla base degli aborti potrebbe essere simile a quello del rame contenuto nei dispositivi contraccettivi: ci

sarebbe una deposizione del metallo a livello endometriale che va ad ostacolare l'impianto dell'embrione.(139) Le vigenti linee guida raccomandano di proseguire il trattamento farmacologico per tutta la durata della gravidanza; ciò assicura infatti una alta probabilità di outcome favorevole.(42, 135, 140-142) Le complicanze in corso di gravidanza descritte in pazienti con MW sono state: preeclampsia/ipertensione gestazionale, trombocitopenia ed emolisi.(135, 143)

Riguardo l'impatto del trattamento farmacologico, è noto un potenziale effetto teratogeno della D-penicillamina.(144) Cohen et al. e Keen et al. hanno osservato, sulla base di studi su modello animale, che il principale fattore nella produzione di teratogenesi con penicillamina e trientina è la carenza di rame nel feto.(145-147) Per questi motivi, è indicata la riduzione del dosaggio durante la gestazione alla minima dose efficace per il controllo della MW. Lo zinco invece non ha mostrato avere potenziali rischi per il feto per cui il trattamento va proseguito immutato per tutta la gestazione.(17, 42, 144) I dati sulla teratogenicità dei trattamenti sono tuttavia discordanti; le principali anomalie fetali e complicanze perinatali osservate sono basso peso alla nascita e malformazioni congenite.(133)

L'effettiva influenza della patologia sulla fertilità non è comunque ancora ben chiara: da qui la necessità di indagare ulteriormente il reale impatto della MW sulla fertilità in entrambi i sessi. Scopo del presente progetto era valutare prospetticamente l'abilità procreativa di una coorte di pazienti affetti da MW con fenotipo prevalente epatologico, precocemente diagnosticati ed in trattamento da almeno 5 anni.

V.II Pazienti e metodi

Lo studio è stato condotto prospetticamente arruolando i pazienti con diagnosi di MW seguiti in follow-up presso l'AOU Federico II di Napoli al fine di studiarne la salute riproduttiva e compararla a controlli sani paragonabili per sesso, età e BMI. Oltre le capacità procreative della specifica popolazione, anche l'eventuale impatto della terapia della MW sulla fertilità veniva analizzato. I pazienti erano arruolati dal Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Sezioni di Pediatria e Medicina Interna, e dal Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, sezione di Neurologia. I controlli sani sono stati reclutati tra i pazienti afferenti al Centro di

Sterilità e Infertilità di coppia del Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproductive e Odontostomatologiche, Sezione di Ginecologia, della stessa AOU. In particolare, sono state selezionate donne di coppie in cui l'infertilità era legata a fattore maschile e uomini da coppie con infertilità per fattore femminile. I pazienti erano eleggibili per lo studio se prestavano il loro consenso informato alla partecipazione allo studio e al trattamento dei dati personali, se avevano diagnosi confermata per MW ad interessamento epatico ed erano in trattamento da almeno 5 anni. Criteri di inclusione per le femmine erano inoltre: età tra 17 e 36 anni e BMI tra 18 e 28 Kg/m². Erano escluse le donne con comorbidità come endocrinopatie, sindrome dell'ovaio policistico, endometriosi, donne in trattamento con farmaci contraccettivi o altri in grado di alterare la fertilità, donne gravide. Criteri di inclusione per i maschi erano: età tra 17 e 40 anni e BMI tra 19 e 29 Kg/m². Criteri di esclusione per la popolazione maschile erano: altre malattie genetiche o patologie autoimmuni o endocrinopatie, trattamenti in atto potenzialmente in grado di alterare la fertilità. Per la selezione della popolazione di controllo sono stati utilizzati gli stessi criteri di inclusione ed esclusione, fatta eccezione per la diagnosi di Wilson.

Per ogni paziente incluso nello studio venivano raccolti i seguenti dati: età all'arruolamento, BMI all'osservazione, età alla diagnosi, durata del follow-up, terapie effettuate in precedenza per la malattia di Wilson e terapia in atto con relativi dosaggi, valutazione della aderenza al trattamento sulla base di criteri anamnestici e laboratoristici, fenotipo clinico della malattia di Wilson, genotipo, stato civile, eventuali gravidanze già portate a termine e numero e cause di eventuali aborti o complicanze riscontratesi in gravidanza o al parto e terapie effettuate in corso di gestazione per le donne, numero e stato di salute dei figli dei pazienti.

I pazienti con MW erano classificati in Responders e Non-Responders sulla base dei dati clinici, degli enzimi epatici e dei parametri del metabolismo del rame.(109) In caso di mancata risposta al trattamento, segni di scarsa aderenza, dosaggio inadeguato o altre coesistenti cause di epatopatia erano ricercate.

Per ogni paziente di sesso maschile l'analisi del liquido seminale al tempo 0 e dopo tre settimane è stata effettuata secondo i criteri WHO 2010, rispettando i 3-5 giorni di

astinenza prima della raccolta. L'eiaculato è stato valutato per aspetto, volume, viscosità, pH, studio della motilità, vitalità, concentrazione e morfologia spermatozoaria, eventuale presenza di cellule diverse dagli spermatozoi. È stata inoltre effettuata la misurazione della frammentazione del DNA spermatico mediante Sperm chromatin dispersion - Halosperm. La valutazione del liquido seminale è stata poi integrata con valutazione laboratoristica dei seguenti parametri: FSH, LH, PRL, testosterone, FT3, FT4, TSH.

Per ogni paziente di sesso femminile veniva praticato un prelievo al secondo-terzo giorno del ciclo mestruale per determinare i livelli di FSH, LH, estradiolo e AMH ed una ecografia pelvica per la conta dei follicoli antrali (AFC) entro il 5° giorno del ciclo mestruale. Ulteriori ecografie erano effettuate successivamente per monitorare l'ovulazione e procedere al dosaggio del progesterone in fase luteale. Venivano inoltre testati i livelli di prolattina, TSH, FT4 ed FT3.

La popolazione era stratificata per età alla diagnosi, clinica e trattamento in atto e tutti i risultati comparati a quelli del gruppo di controllo. Le variabili continue sono state riportate come media \pm deviazione standard; le variabili categoriche sono state riportate in numero assoluto e percentuali. La distribuzione delle variabili continue è stata valutata con test di Shapiro. Le variabili continue a distribuzione parametrica sono state confrontate tra i gruppi di studio con test t di Student. Le variabili continue a distribuzione non parametrica sono state confrontate tra i gruppi con Mann-Whitney U test. Le variabili discrete sono state studiate con il Test esatto di Fisher. Il software utilizzato era SPSS 20.0. Un valore di p-value <0.05 era considerato statisticamente significativo.

V.III Risultati

Dei 79 pazienti valutati per lo studio, 26 pazienti di cui 12 maschi erano inclusi sulla base dei criteri di inclusione ed esclusione definiti. Tutti, eccetto una donna, erano diagnosticati in età pediatrica ed il tempo medio totale di follow-up era 21.7 ± 6.6 anni. Al momento della diagnosi, 23 (88.5%) pazienti presentavano ipertransaminasemia,

21(80.8%) avevano epatomegalia e 6 (23.1%) splenomegalia; nessun paziente presentava sintomi neurologici. Un paziente aveva ricevuto diagnosi in fase presintomatica in seguito a screening familiare.

Il campione di pazienti di sesso maschile presentava un'età media all'arruolamento di 29.6 ± 5.38 anni ed un'età media alla diagnosi di MW di 6.5 ± 3.9 anni. Il BMI medio era 24.6 ± 4.33 Kg/m². Undici (91.7%) pazienti erano Responder al trattamento, mentre un paziente risultava Non Responder per verosimile scarsa aderenza alla terapia. Due pazienti avevano segni di ipertensione portale e ipersplenismo. Nove (75%) pazienti erano stati trattati inizialmente con D-penicillamina e successivamente con sali di zinco; due (16.7%) pazienti avevano sempre effettuato terapia con zinco e di essi uno passava a D-penicillamina; 1 (8.3%) paziente era trattato esclusivamente con D-penicillamina. Nel complesso 10 pazienti erano in terapia con zinco al momento dello studio e 2 in D-penicillamina. Sei (50%) dei dodici pazienti risultavano sposati e/o desiderosi di prole; 4 dei 6 avevano nel complesso 5 figli. Nessuno di loro riportava storia di infertilità.

Il gruppo di controllo era costituito da 12 uomini di cui 9 completavano il protocollo di studio. Essi non differivano dai pazienti per età media all'osservazione (30.8 ± 6.25 anni, $p=0.6$) e BMI (24.3 ± 2.36 Kg/m², $p=0.8$).

L'analisi comparata tra pazienti e controlli del liquido seminale (**Tabella 4**) mostrava nei pazienti Wilson una ridotta motilità spermatica totale ($p=0.03$) e ad un'ora ($p=0.01$); il dato era confermato quando i soli pazienti Responder erano comparati ai controlli ($p=0.02$ per la motilità totale; $p=0.01$ per la motilità ad un'ora). Nessuna differenza era evidenziata tra i pazienti con alterata motilità e quelli con normale motilità in termini di età, BMI, genotipo, durata del follow-up, tipo di terapia. Una severa oligo-asteno-teratozoospermia era identificata nel paziente Non Responder, mentre solo uno dei pazienti Responder, con non ottimale aderenza alla terapia, mostrava oligospermia. Pazienti e controlli erano comparabili per conta spermatica e percentuale di forme normali ed il dato era confermato quando si paragonavano i soli Responder ai controlli. La misurazione della frammentazione del DNA spermatico era comparabile tra pazienti e controlli, e nella norma. I parametri ormonali erano anch'essi nella norma (**Tabella 5**) e comparabili tra pazienti e controlli.

	Maschi con MW (n=12)	Controlli (n=9)	p-value
	Responder (n=11)		
Età all'osservazione (anni)	29.6±5.38	30.80±6.25	0.6
	30.6±4.40		0.9
BMI (Kg/m ²)	24.6±4.33	24.3±2.36	0.8
	24.35±2.9		0.9
Conta spermatica (x10 ⁶ /ml)	51.52±37.83	66.44±27.08	0.3
	56.72±35.60		0.4
Conta spermatica (x10 ⁶ /eiaculato)	169.48±137.43	204.8±98.06	0.5
	188.14±128.40		0.7
Motilità totale (%)	44.78±21.65	61.88±11.03	0.03
	46.64±14.35		0.02
Motilità ad 1 ora (%)	47.85±21.52	69.44±11.02	0.01
	50.58±18.50		0.01
Forme normali (%)	5.75±3.05	5.55±2.12	0.8
	6.16±2.96		0.6

Tabella 4. Caratteristiche del liquido seminale in 12 pazienti con malattia di Wilson (MW) maschi (di cui 11 Responder) e 9 controlli.

	Maschi con MW (n=12)	Femmine con MW (n=14)
FSH (mIU/ml)	3.80±1.4	5.44±2.81
LH (mIU/ml)	3.7±1.8	3.36±1.65
Testosterone (ng/dl)	444.3±181.4	ND
Estradiolo (pg/ml)	ND	89.60±60.45
PRL (ng/ml)	6.60±1.71	10.25±5.60
TSH (μIU/ml)	2±1.9	2.21±1.22
FT3 (pg/ml)	3.5±0.4	3.4±0.6
FT4 (ng/dl)	1.1±0.2	1.01±0.12

Tabella 5. Profilo ormonale in 12 maschi e 14 femmine affette da malattia di Wilson (MW). ND: non determinato.

Le pazienti di sesso femminile presentavano un'età media all'arruolamento di 27.10±6.93 anni ed un'età media alla diagnosi di 5.42±5.8 anni. Il BMI medio all'osservazione era 22±2.8 Kg/m². Undici (78.6%) pazienti erano Responder alla

terapia e 3 Non Responder per scarsa aderenza. Una sola donna, poco aderente al trattamento, aveva sviluppato cirrosi con lieve ipersplenismo e sintomatologia neurologica. La durata media del trattamento era 19.71 ± 5.88 anni. Sette (50%) di 14 pazienti avevano iniziato il trattamento con D-penicillamina ed una (7.1%) con trientina; tutte shiftavano successivamente a zinco. Sei pazienti (42.9%) erano trattate con zinco come terapia di prima linea e solo una paziente passava a D-penicillamina per effetti collaterali da zinco. Al momento dello studio, 13 (92.8%) pazienti erano in terapia con zinco ed una con D-penicillamina.

Otto (57.1%) pazienti erano sposate e/o desiderose di prole e di queste, quattro avevano nel complesso 6 figli. Due (14.3%) riportavano storia di aborti spontanei e altre due (14.3%) storia di infertilità.

Il gruppo di controllo era costituito da 15 donne di cui 10 completavano il protocollo di studio. Esse non differivano dalle pazienti per età media (26 ± 4.76 anni, $p=0.6$) e BMI (20.4 ± 2.37 Kg/m², $p=0.1$)

Nessuna significativa differenza era riscontrata tra pazienti e controlli in termini di markers di riserva ovarica (**Tabella 6**). In merito ai valori di AMH, essi erano stratificati per età e 2 pazienti presentavano un risultato incluso tra il 5° ed il 25° percentile, 5 tra il 25° ed il 50° percentile, 2 tra il 50° ed il 75° percentile e 5 oltre il 75° percentile. Nel gruppo di controllo, tre avevano valori tra il 5° ed il 25° percentile, 4 tra il 25° ed il 50° percentile, 1 tra il 50° ed il 75° percentile e 2 oltre il 75° percentile. I valori di AMH erano comparabili quando valutati tra donne inizialmente trattate con D-penicillamina e quelle trattate con zinco (4.79 ± 2.82 vs 5.85 ± 3.48 ng/ml rispettivamente, $p=0.42$). Il profilo ormonale differiva tra pazienti e controlli solo in termini di LH (3.36 ± 1.65 vs 6.25 ± 1.03 mIU/ml rispettivamente, $p<0.001$); tutti gli altri ormoni erano inoltre nel range di normalità. I valori di progesterone al 21° giorno del ciclo ovarico (valori medi 10.4 ± 6.7 ng/ml) ed il quadro ecografico erano suggestivi di ovulazione nel 50% delle donne studiate.

	Femmine con MW (n=14)	Controlli (n=10)	p-value
	Responder (n=11)		
Età all'osservazione (anni)	27.1±6.93	26±4.76	0.6
	26.8±6.49		0.7
BMI (Kg/m ²)	22±2.80	20.4±2.37	0.1
	22.1±3.02		0.1
AMH (ng/ml)	5.4±3.28	3.5±1.76	0.08
	4.91±3.23		0.2
AFC	16±3.6	13.14±5.20	0.15
	14.71±2.84		0.4
FSH (mIU/ml)	5.44±2.81	5.60±3.42	0.9
	5.23±3.63		0.8

Tabella 6. Markers di riserva ovarica in 14 femmine con malattia di Wilson (MW) (di cui 11 Responder) ed in 10 controlli.

V.IV Discussione

In letteratura non sono presenti studi che valutino sistematicamente la funzione riproduttiva dei pazienti affetti da MW ed in particolare, la riserva ovarica e la qualità del liquido seminale. Questo lavoro rappresenta il primo studio prospettico sull'argomento. Esso analizza una casistica di pazienti con MW ad esordio epatico e con un lungo follow-up medio ed è stato reso possibile dalla disponibilità di un Team multidisciplinare dedicato alla gestione diagnostico-terapeutica dei pazienti con MW. Il lavoro è focalizzato, inoltre, su un aspetto precedentemente impensabile da investigare in una patologia che era tardivamente diagnosticata e caratterizzata da una popolazione di pazienti seriamente compromessi dalla patologia. Per questo motivo, rappresenta anche uno stimolo a dirigersi verso nuovi percorsi di ricerca per la MW, mirati al miglioramento della qualità di vita di pazienti per cui è ormai nota una sopravvivenza sovrapponibile alla popolazione generale quando precocemente diagnosticati e adeguatamente trattati.

Obiettivo primario dello studio era valutare prospetticamente il potenziale riproduttivo di pazienti con MW in terapia di mantenimento. I risultati ottenuti hanno evidenziato una riduzione della sola motilità spermatica nei maschi con MW senza identificarne

fattori predittivi, così che è difficile stabilire se essa sia da attribuirsi alla MW o al suo trattamento. Sebbene in precedenza sia stato ipotizzato un ruolo chiave del genotipo, nella casistica esaminata non è stato possibile identificare una correlazione genotipo-fenotipo per l'esiguità del campione e l'eterogeneità dello stesso. Tuttavia, due pazienti omozigoti per la mutazione H1069Q, in trattamento con D-penicillamina il primo e zinco l'altro, avevano normale spermio e un figlio ognuno, così che appare più plausibile che l'alterazione del liquido seminale sia da correlarsi alla patologia di base. A dimostrazione di ciò è il dato che il paziente con severa oligo-asteno-teratozoospermia era un Non Responder scarsamente aderente al trattamento prescritto. Dato che la gran parte dei pazienti arruolati presentavano una normale funzione epatica e buone condizioni cliniche generali, è ipotizzabile che la riduzione della motilità spermatica, identificata anche nei pazienti Responder, sia attribuibile alla MW e probabilmente alla ridotta capacità ossidante per riduzione della superossido dismutasi rame-zinco.(148)

Per quanto riguarda la concentrazione degli spermatozoi, non emergeva una differenza statisticamente significativa anche se con un esiguo numero di casi valutati, ma era possibile osservare un trend alla riduzione del numero degli spermatozoi potendo, però, essere definiti oligospermici solo due pazienti.

Per quanto riguarda le pazienti di sesso femminile, non venivano riscontrate differenze statisticamente significative tra il gruppo di studio e di controllo in merito ai markers della riserva ovarica. Ciò consente di ipotizzare che se precocemente diagnosticata e trattata, la MW e la sua terapia non interferiscano con la riserva ovarica, verosimilmente influenzata invece dalla severità di malattia. Similmente allo studio di Kaushansky et al. il presente lavoro mostrava ridotti livelli di LH nelle donne con MW sebbene non sia possibile darne una plausibile spiegazione. Per questo e l'alta percentuale di cicli anovulatori dimostrata, più ampi studi multicentrici sono necessari.

In conclusione, nonostante il limite di una ristretta dimensione del campione studiato, è possibile affermare che nei pazienti con MW ad esordio epatico, precocemente diagnosticati e trattati, non sembra esserci una alterazione del potenziale riproduttivo sebbene vi sia una ridotta motilità spermatica nel sesso maschile e bassi livelli di LH nel sesso femminile. I pazienti con peggior controllo della malattia sembrano essere quelli

con una maggiore compromissione della salute riproduttiva, ancora una volta stressando l'importanza della diagnosi precoce.

I risultati di questo studio sono stati pubblicati in Reproductive Biomedicine Online nel 2021 (Iorio GG, Conforti A, Vallone R, Carbone L, Matarazzo M, De Rosa A, De Rosa P, Picarelli S, Fedele F, Perruolo G, Formisano P, Iorio R, Alviggi C, Di Dato F. Reproductive function of long-term treated patients with hepatic onset of Wilson's disease: a prospective study. Reprod Biomed Online. 2021 Apr;42(4):835-841).

Capitolo VI

Ottimizzazione della posologia dello zinco in relazione ai parametri del metabolismo di rame e zinco ed agli effetti collaterali

VI.I Introduzione e razionale dello studio

I sali di zinco sono, come già precedentemente descritto, indicati per il trattamento dei pazienti asintomatici, come terapia di mantenimento e possono essere utilizzati come terapia di prima linea per i pazienti con esordio neurologico.(17, 42-44) Vista la progressione nel tempo della patologia, viene da sé che quando la diagnosi è posta precocemente in età pediatrica, essi rappresentano uno dei trattamenti di scelta per la terapia long-life della malattia nel bambino. Tuttavia, lo zinco è uno dei pochi farmaci la cui posologia non tiene conto del peso, ma soltanto dell'età. Ciò determina che bambini in un range d'età ampio con pesi notevolmente differenti, quali possono essere tra i 6 e i 16 anni, assumano lo stesso dosaggio di farmaco. Come inoltre riportato, il monitoraggio della terapia con zinco è effettuato sulla base di cupruria, zincuria e zinchemia, ma non ci sono raccomandazioni precise su possibili aggiustamenti terapeutici da praticare quando i parametri suddetti non rientrano nei target desiderati. Anche nel caso in cui la cupruria fosse $<30 \mu\text{g}/24\text{h}$ e quindi il paziente necessiti di un aggiustamento terapeutico,(44) come modulare il trattamento è lasciato alla mera esperienza del clinico. Allo stesso modo, non ci sono indicazioni sulle modifiche da apportare quando i livelli di zincuria o zinchemia aumentano eccessivamente. L'interruzione temporanea della terapia con lo zinco non è raccomandata a causa dell'alto rischio di insufficienza epatica acuta. C'è poi da sottolineare che, con il miglioramento della sopravvivenza media dei pazienti, sempre più frequenti in letteratura sono i case-report relativi a deficit di rame in pazienti destinati ad un trattamento long-life decopperizzante. Infine, sebbene sia riportato che l'iperenzimemia pancreatica da assunzione di zinco sia un effetto avverso benigno, non esistono studi che ne dimostrino a lungo termine il mancato impatto negativo sulla funzionalità endocrina ed esocrina del pancreas. Sono stati riportati, infatti, casi di danno pancreatico da zinco nell'uomo e nell'animale.(149-151)

In questo contesto, sembra auspicabile determinare una dose individualizzata di zinco basata su parametri clinici e biochimici. Da tutto ciò origina l'idea del seguente studio, di provare ad identificare nei pazienti con la MW una variabile che consenta di prescrivere un dosaggio personalizzato di zinco adeguato a garantirne l'efficacia, prevenendo il rischio a lungo termine sia di tossicità che di carenza di rame.

VI.II Obiettivo dello studio

L'obiettivo principale dello studio è di identificare eventuali correlazioni tra la dose di zinco, normalizzata per peso o per superficie corporea, e i parametri del metabolismo di rame e zinco.

Gli obiettivi secondari sono la valutazione di eventuali correlazioni tra i parametri del metabolismo di rame e zinco con il profilo lipidico e con gli enzimi pancreatici, al fine di valutare l'impatto di tali metalli sulle loro alterazioni.

VI.III Pazienti e metodi

Venivano valutati pazienti affetti da MW in follow-up presso il Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, nelle Sezioni di Pediatria e di Medicina Interna, e presso il Dipartimento di Neuroscienze e Scienze riproduttive ed odontostomatologiche, dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Erano inclusi nell'analisi i pazienti con diagnosi confermata di MW sulla base del test genetico o della determinazione del rame intraepatico e per cui erano disponibili dati di follow-up riguardanti durata della malattia, gestione terapeutica, parametri del metabolismo del rame ed enzimi epatici. Venivano invece esclusi quelli in terapia combinata o sola terapia chelante per tutto il periodo di follow-up e i pazienti con follow-up < 1 anno.

Per ogni paziente venivano retrospettivamente raccolti i seguenti dati: età alla diagnosi; modalità di esordio (epatico, neurologico e/o psichiatrico, presintomatico); dati clinici (peso e altezza) e di laboratorio (zincuria, cupruria, zinchemia, cupremia, AST, ALT, colesterolo, trigliceridi, lipasi e amilasi) annualmente dal secondo anno di follow-up; tipo di sale di zinco assunto e dose; notizie anamnestiche riguardanti l'aderenza al trattamento. Venivano calcolate per ogni osservazione la dose di zinco pro-Kg e pro-Superficie corporea (m²). Venivano esclusi i periodi in cui il paziente praticava terapia

concomitante con farmaci diversi da quelli per la MW o in cui il paziente faceva terapia chelante o combinata o se c'era una gravidanza in atto. La buona aderenza era valutata sulla base di cupruria $<75\mu\text{g}/24\text{h}$, zincuria $> 2000 \mu\text{g}/ 24\text{h}$ e zinchemia $>125 \mu\text{g}/\text{dl}$. L'alterazione di almeno 2 dei precedenti parametri veniva considerata come indicativa di scarsa aderenza al trattamento.

Le osservazioni raccolte venivano analizzate prima nel complesso; successivamente quelle relative alla sola terapia con zinco acetato (ZnA) e zinco solfato (ZnS) venivano analizzate separatamente, considerando prima ogni gruppo in generale, indipendentemente dalla compliance, e poi solo le osservazioni complianti di ogni sottogruppo. Erano anche analizzate le correlazioni tra altre variabili: zincuria, cupruria, zinchemia, colesterolo, trigliceridi, lipasi e amilasi. Per valutare gli effetti collaterali pancreatici della terapia con zinco le osservazioni erano distinte in due gruppi, con e senza iperenzimemia pancreatica a seconda che presentassero almeno una alterazione di tali enzimi o entrambi gli enzimi nella norma.

Le variabili continue sono state riportate in forma di media \pm deviazione standard o mediana e range; le variabili categoriche sono state riportate in numero assoluto e percentuale. Le variabili continue sono state confrontate tra i gruppi con test t student o Mann-Whitney U-test. Le variabili discrete erano esaminate con test del Chi quadro. L'analisi di regressione lineare semplice è stata effettuata per le variabili continue. L'analisi statistica dei dati è stata elaborata tramite GraphPad Prism 9 e SPSS 28.0. Il p-value è stato considerato significativo per valori inferiori a 0.05.

VI.IV Risultati

Risultavano eleggibili per lo studio 52 pazienti. La corte di studio era costituita da 34 maschi (65.4%); 16 (30.8%) pazienti erano in età pediatrica.

L'età media alla diagnosi di MW era di 6 ± 4.5 anni. 43 pazienti (82.7%) esordivano con segni di epatopatia; in 2 (3.8%) il fenotipo clinico d'esordio era caratterizzato da epatopatia e sintomi neurologici e/o psichiatrici; 7 (13.5%) erano diagnosticati in fase asintomatica mediante screening familiare. La durata mediana del follow-up era di 19.71 anni (range 2.1-38 anni). Della coorte di pazienti studiati, 20 (38.5%) avevano praticato

in passato terapia con zinco solfato per poi passare a zinco acetato; 25 pazienti della coorte (48.1%) avevano effettuato terapia con chelante, in particolare D-penicillamina, per poi switchare a sali di zinco per effetti collaterali o per passaggio a terapia di mantenimento; 7 pazienti della corte (13.4%) erano sempre stati in terapia con zinco acetato.

Venivano inclusi i dati per 181 osservazioni di pazienti in terapia con ZnS, di cui 117 (64.6%) complianti; 178 erano le osservazioni incluse per i pazienti in terapia con ZnA, di cui 137 (76.9%) complianti ($p=0.011$). Il totale di osservazioni di pazienti in terapia con zinco (sia solfato, sia acetato) era quindi di 359, di cui 254 (70.8%) complianti. Le osservazioni in cui si evidenziava iperenzimemia pancreatica erano 90 (27.3%) su 330 per cui erano disponibili i dati: 42/176 (23.9%) nel gruppo ZnA e 48/154 (31.2%) nel gruppo ZnS ($p=NS$). Quando si valutavano i soli pazienti complianti, l'iperenzimemia pancreatica si osservava in 67/238 (28.2%) casi, 38/136 (27.9%) tra quelli in ZnA e 29/102 (28.4%) tra quelli in ZnS ($p=NS$). Nessuna associazione statisticamente significativa si evidenziava tra complianti e non, in termini di iperenzimemia pancreatica nell'intera popolazione e nell'ambito del sottogruppo ZnS. L'iperenzimemia era invece significativamente più frequente nelle valutazioni con buona aderenza al trattamento con ZnA rispetto a quelle con scarsa aderenza (38.8% vs 11.1%, $p=0.02$).

VI.IV.I Analisi dell'intera popolazione

Nell'intera popolazione, quando distinta in base al trattamento (ZnA vs ZnS), si osservavano differenze statisticamente significative per zinchemia (221.89 ± 63.06 vs 183.19 ± 44.1 $\mu\text{g/dl}$, $p < 0.001$), zincuria (4149.48 ± 1919.79 vs 3318.41 ± 1840.87 $\mu\text{g/24h}$, $p < 0.001$) e colesterolo totale (152.28 ± 34.91 vs 180.53 ± 54.78 mg/dl , $p < 0.001$). Nei complianti (ZnA vs ZnS) erano significative zinchemia (226.2 ± 63.32 vs 191.06 ± 43.67 $\mu\text{g/dl}$, $p < 0.001$), zincuria (4408.07 ± 1791.08 vs 3685.6 ± 1749.34 $\mu\text{g/24h}$, $p = 0.007$), cupruria (49.52 ± 21.71 vs 57.07 ± 28.79 $\mu\text{g/24h}$, $p = 0.044$), cupremia (34.48 ± 21.48 vs 24.73 ± 18.99 mg/dl , $p = 0.025$) e colesterolo totale (147.9 ± 32.55 vs 167.73 ± 38.27 mg/dl , $p < 0.001$). Quando l'analisi di comparazione veniva effettuata tra complianti e non complianti, si osservavano differenze statisticamente significative in termini di

zinchemia (211.93 ± 58.66 vs 182.67 ± 51.9 $\mu\text{g/dl}$, $p < 0.001$), zincuria (4138.6 ± 1805.37 vs 2783.58 ± 1930.55 $\mu\text{g/24h}$, $p < 0.001$), cupruria (52.62 ± 25.06 vs 113.82 ± 75.7 $\mu\text{g/24h}$, $p < 0.001$), colesterolo (157.07 ± 36.6 vs 191.01 ± 63.32 mg/dl , $p < 0.001$). Le differenze per gli enzimi pancreatici nell'intera popolazione non venivano valutate perché nel corso degli anni sono cambiati i ranges di riferimento e le metodiche utilizzate.

Quando le osservazioni erano distinte, invece, sulla base della presenza di iperenzimemia pancreatica, quelle con iperenzimemia mostravano valori medi più bassi di cupruria (56.37 ± 34.51 vs 70.78 ± 53.11 $\mu\text{g/24h}$, $p = 0.013$) e più elevati di colesterolo (181.04 ± 72.11 vs 158.89 ± 34.30 mg/dl , $p = 0.006$). L'analisi effettuata nei soli pazienti complianti non confermava questi dati, ma evidenziava invece una cupremia significativamente più bassa nei pazienti con iperenzimemia (21.54 ± 14.07 vs 33.14 ± 21.78 mg/dl , $p = 0.012$).

Le correlazioni tra le variabili nell'intero campione sono riportate in **Figura 7**.

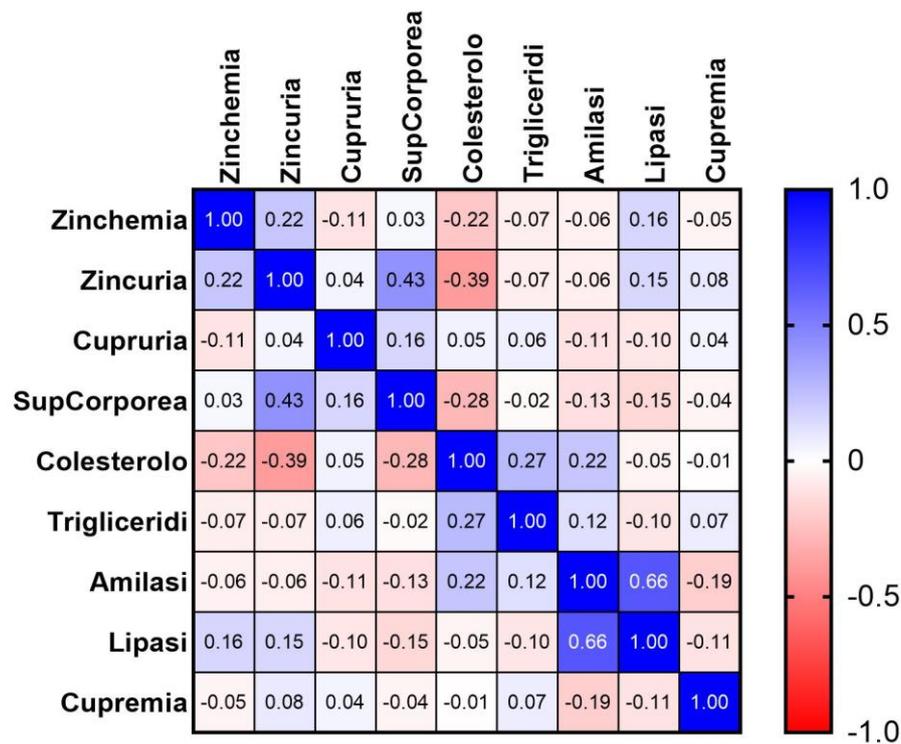


Figura 7. Matrice di correlazione per 359 osservazioni riguardanti 52 pazienti con malattia di Wilson.

In **Figura 8** sono riportate quelle relative alle osservazioni per cui vi era buona aderenza al trattamento.

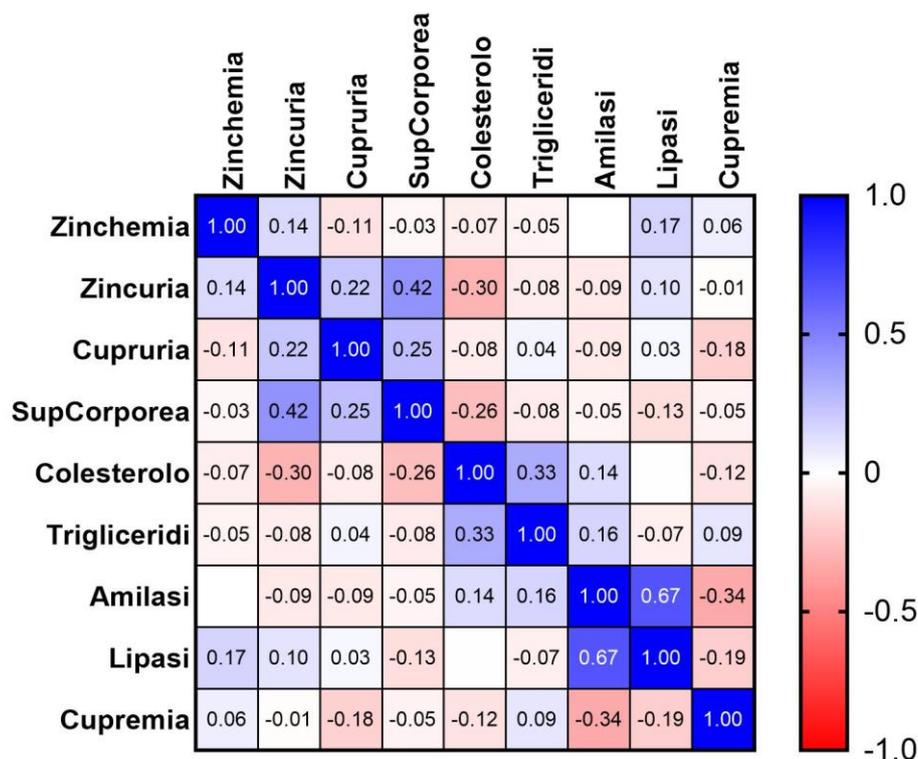


Figura 8. Matrice di correlazione per 254 osservazioni in cui è stata valutata una buona aderenza al trattamento.

Le principali significatività statistiche riscontrate erano relative alla correlazione diretta tra zinchemia e zincuria ($p=0.001$) (**Figura 9**), quella indiretta tra colesterolo e zinchemia ($p<0.001$) (**Figura 10**) o zincuria ($p<0.001$) (**Figura 11**), e quella positiva tra colesterolo e trigliceridi ($p<0.001$) (**Figura 12**). Inoltre, l'amilasi risultava correlata positivamente alla lipasi ($p<0.001$) (**Figura 13**) e negativamente alla cupremia ($p=0.015$) (**Figura 14**).

Quando l'analisi era limitata al gruppo compliant, si confermavano le correlazioni positive tra colesterolo e trigliceridi ($p<0.001$) e amilasi e lipasi ($p<0.001$). Erano anche presenti correlazioni inverse tra zincuria e colesterolo ($p<0.001$), amilasi e cupremia ($p<0.001$).

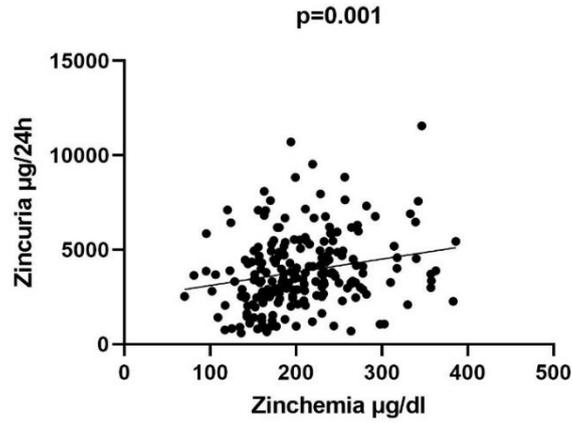


Figura 9. Correlazione diretta tra zinchemia e zincuria in 359 osservazioni di 52 pazienti con malattia di Wilson.

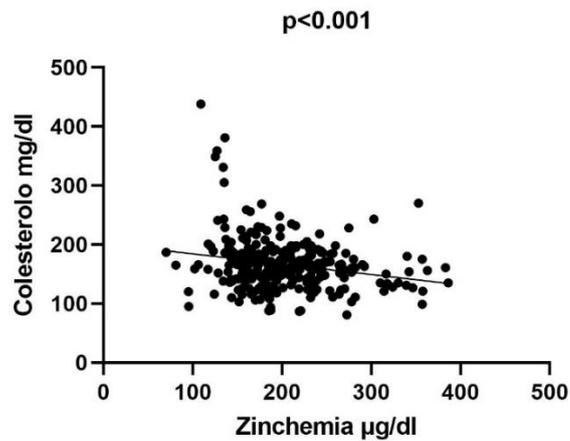


Figura 10. Correlazione inversa tra zinchemia e colesterolo sierico in 359 osservazioni di 52 pazienti con malattia di Wilson.

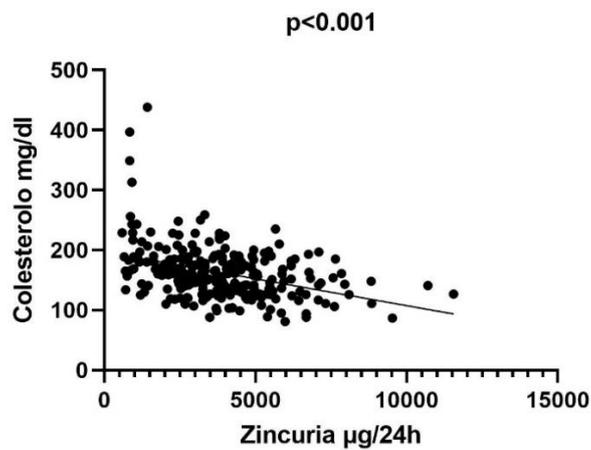


Figura 11. Correlazione inversa tra zincuria e colesterolo sierico in 359 osservazioni di 52 pazienti con malattia di Wilson.

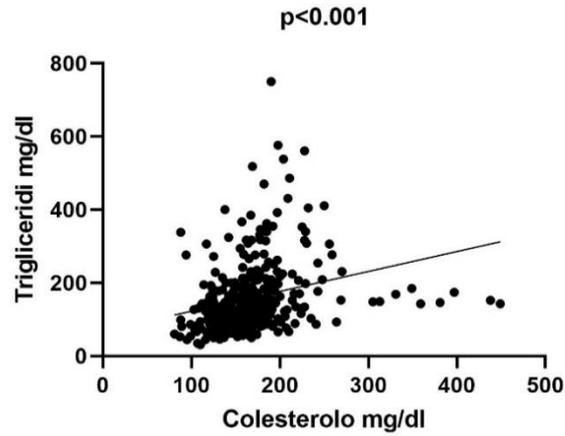


Figura 12. Correlazione diretta tra colesterolo e trigliceridi sierici in 359 osservazioni di 52 pazienti con malattia di Wilson.

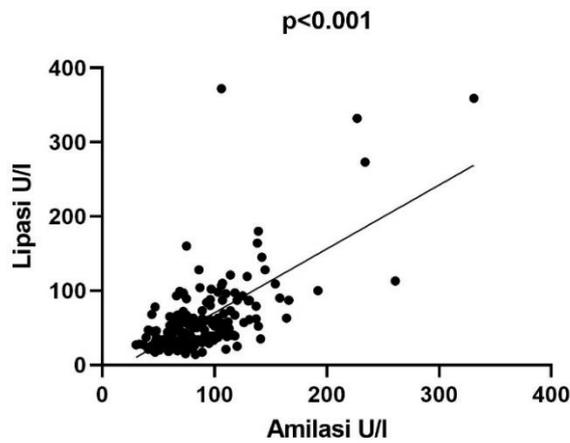


Figura 13. Correlazione diretta tra amilasi e lipasi sieriche in 359 osservazioni di 52 pazienti con malattia di Wilson.

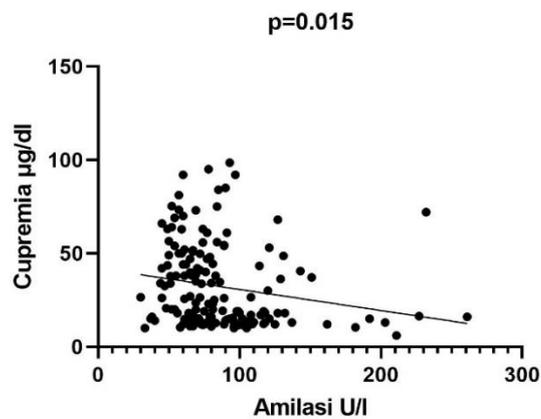


Figura 14. Correlazione inversa tra amilasi sierica e cupremia in 359 osservazioni di 52 pazienti con malattia di Wilson.

VI.IV.II Analisi dei due sottogruppi ZnA e ZnS

Le caratteristiche dei due sottogruppi di trattamento e le differenze evidenziate tra le osservazioni con buona aderenza al trattamento e non, nell'ambito dei sottogruppi, sono riportate in **Tabella 7**. In entrambi i sottogruppi si evidenziava, come atteso, una differenza statisticamente significativa tra complianti e non, in termini di zincuria e cupruria ($p<0.001$ e $p=0.004$ rispettivamente nel gruppo ZnA e ZnS per la zincuria; $p<0.001$ in entrambi i gruppi per la cupruria). Da notare, valori significativamente più elevati di colesterolemia nelle osservazioni con scarsa aderenza al trattamento rispetto a quelle con buona compliance ($p=0.001$ e $p<0.001$ rispettivamente nel gruppo ZnA e ZnS).

	Zn Acetato			Zn Solfato		
	Totale	Buona Aderenza	<i>p</i> -value	Totale	Buona Aderenza	<i>p</i> -value
		Scarsa Aderenza			Scarsa Aderenza	
Dose mg/Kg/die	1.92±0.55	1.90±0.54	0.493	8.41±2.89	8.25±2.85	0.323
		1.97±0.57			8.70±2.97	
Dose mg/m²/die	65.44±17.10	64.57±17.26	0.219	265.52±74.40	259.65±73.18	0.154
		68.55±16.4			276.40±76.01	
Zinchemia µg/dl	221.89±63.06	226.2±63.32	0.09	183.19±44.10	191.06±43.67	0.007
		204.07±59.77			169.47±41.84	
Zincuria µg/24h	4149.48±1919.79	4408.17±1791.08	<0.001	3318.41±1840.87	3685.60±1749.34	0.004
		2990.18±2079.57			2640.54±1834.37	
Cupremia µg/dl	31.85±21.24	34.48±21.48	0.021	34.59±24.87	24.73±18.99	<0.001
		23.64±18.60			45.41±26.30	
Cupruria µg/24h	64.81±48.96	49.52±21.71	<0.001	74.68±56.05	57.07±28.79	<0.001
		122.65±74.60			107.54±76.68	
Colesterolo mg/dl	152.28±34.91	147.9±32.55	0.001	180.53±54.78	168.73±38.27	<0.001
		168.38±38.88			204.30±70.99	
Trigliceridi mg/dl	150.93±94.62	144.29±86.48	0.082	167.37±99.44	165.16±85.66	0.686
		174.55±117.46			171.48±121.61	
Amilasi IU/L	88.93±41.21	91.66±44.43	0.03	110.77±59.25	106.84±57.23	0.250
		79.32±25.13			118.48±62.90	
Lipasi IU/L	58.49±48.93	62.48±53.23	0.069	71.43±68.16	72.48±71.57	0.819
		45.11±26.90			62.67±33.53	

Tabella 7. Caratteristiche clinico-laboratoristiche di 359 osservazioni in 52 pazienti con malattia di Wilson, suddivise per tipo di zinco e aderenza al trattamento.

Nelle **Tabelle 8 e 9** sono riportate, per ogni sottogruppo di osservazioni, le caratteristiche clinico-laboratoristiche del campione totale e dei soli complianti, distinti sulla base dell'iperenzimemia pancreatica.

	Gruppo ZnA			Gruppo ZnA complianti		
	Iperenzimemia presente	Iperenzimemia assente	<i>p-value</i>	Iperenzimemia presente	Iperenzimemia assente	<i>p-value</i>
Dose mg/Kg/die	2.16±0.54	1.83±0.53	<0.001	2.14±0.57	1.80±0.51	0.001
Dose mg/m²/die	71.78±17.92	63.05±16.19	0.005	71.89±18.40	61.36±15.83	0.001
Zinchemia µg/dl	246.46±68.29	215.02±60.37	0.012	246.88±69.38	218.84±60.14	0.034
Zincuria µg/24h	4116.57±1564.36	4168.90±2039.93	0.889	4116.57±1564.36	4541.33±1877.27	0.24
Cupremia µg/dl	26.25±15.17	32.67±21.95	0.35	25.41±15.71	36.1±22.1	0.146
Cupruria µg/24h	49.77±20.4	69.72±54.51	0.001	50.42±20.31	49.4±22.39	0.815
Colesterolo mg/dl	152.02±31.51	152.36±36.05	0.957	150.29±31.07	146.97±33.21	0.595
Trigliceridi mg/dl	119.59±48.53	159.68±102.87	<0.001	121.35±48.98	152.95±95.74	0.013
Amilasi IU/L	135.33±52.35	73.94±21.27	<0.001	138.42±53.72	73.15±20.45	<0.001
Lipasi IU/L	113.65±69.32	40.1±16.2	<0.001	114.85±72.87	42.15±16.91	<0.001

Tabella 8. Caratteristiche clinico-laboratoristiche di 178 osservazioni in zinco acetato (ZnA) e delle 137 con buona aderenza al trattamento, distinte sulla base dell'iperenzimemia pancreatica.

	Gruppo ZnS			Gruppo ZnS solo complianti		
	Iperenzimemia presente	Iperenzimemia assente	<i>p-value</i>	Iperenzimemia presente	Iperenzimemia assente	<i>p-value</i>
Dose mg/Kg/die	9.41±3.38	8.17±2.82	0.02	9.13±3.97	8.06±2.5	0.199
Dose mg/m²/die	283.7±85.16	266.87±74.38	0.226	269.89±90.48	263.98±71.26	0.071
Zinchemia µg/dl	173.18±40.79	179.92±41.85	0.427	188.13±37.79	185.64±42.92	0.814
Zincuria µg/24h	3262.58±1840.81	3426.2±1926.83	0.715	3422.08±1383.85	3815.48±1889.55	0.485
Cupremia µg/dl	27.06±22.53	33.52±23.89	0.399	13.8±5.02	26.61±19.91	0.006
Cupruria µg/24h	65.42±46.51	72.2±51.45	0.543	54.76±30.18	57.75±28.45	0.713
Colesterolo mg/dl	206.44±87	166.97±30.28	0.003	174.86±50.9	161.44±29.81	0.191
Trigliceridi mg/dl	176.1±136.23	162.49±72.81	0.517	183.97±129.28	157.84±61.78	0.305
Amilasi IU/L	179.42±57.68	79.69±22.31	<0.001	175.83±60.86	79.44±21.8	<0.001
Lipasi IU/L	140.5±98.16	43.8±15.46	0.027	146.71±104.32	43.61±15.44	0.04

Tabella 9. Caratteristiche clinico-laboratoristiche di 181 osservazioni in zinco solfato (ZnS) e delle 117 con buona aderenza al trattamento, distinte sulla base dell'iperenzimemia pancreatica.

Le correlazioni per il gruppo dello ZnA, analizzato nel complesso e includendo le sole osservazioni con buona aderenza al trattamento, sono rappresentate in **Figura 15** e **Figura 16**, rispettivamente.

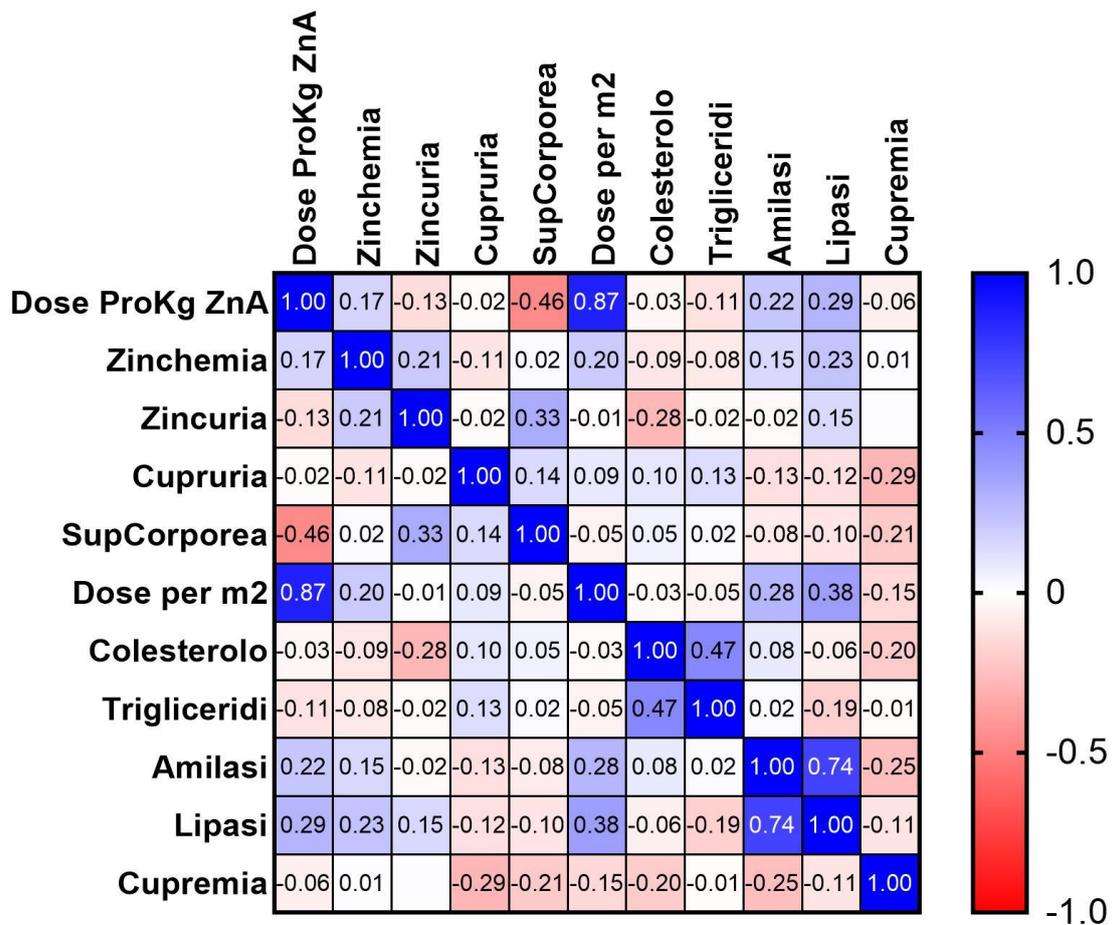


Figura 15. Matrice di correlazione per 178 osservazioni riguardanti il trattamento con zinco acetato.

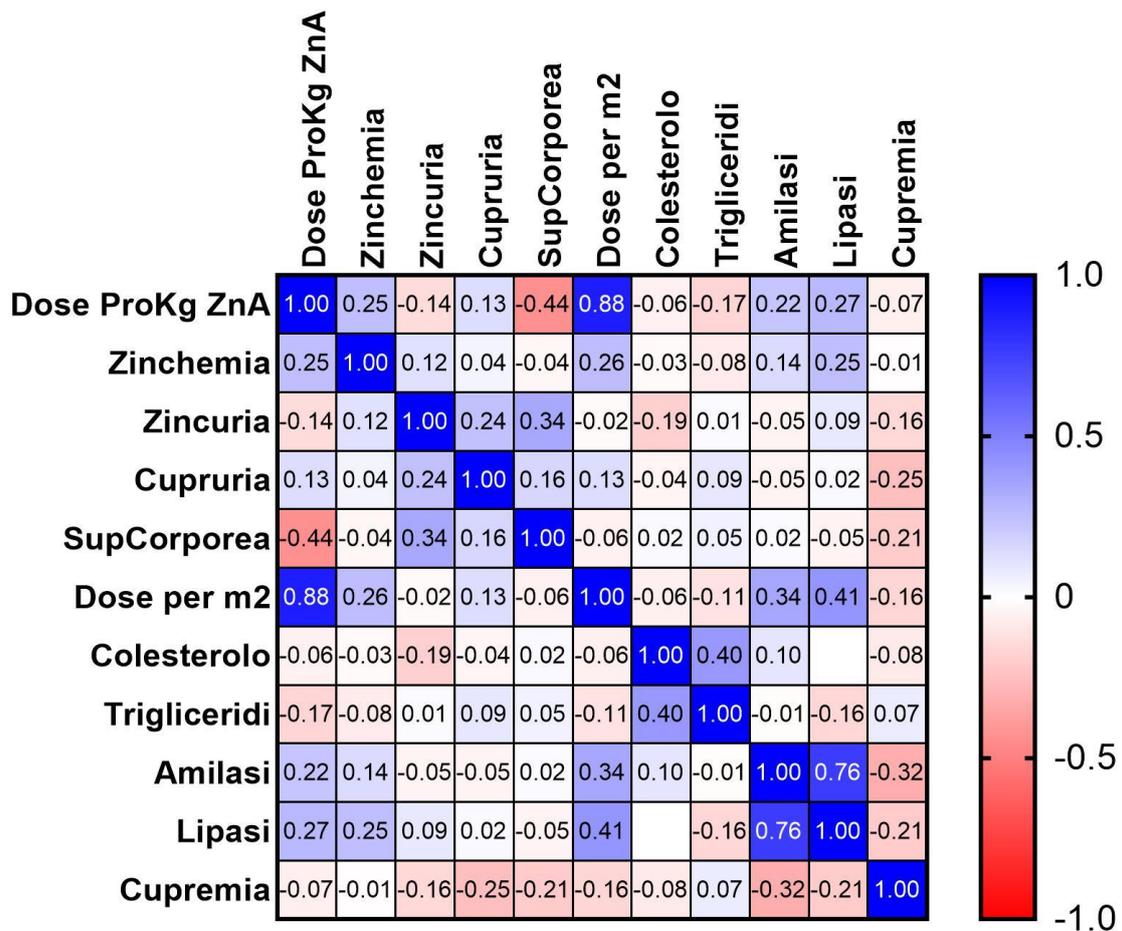


Figura 16. Matrice di correlazione per le sole 137 osservazioni riguardanti il trattamento con zinco acetato in cui è stata evidenziata buona aderenza alla terapia.

In **Figura 17** e **Figura 18** sono riportate le correlazioni per il gruppo di osservazioni dello ZnS.

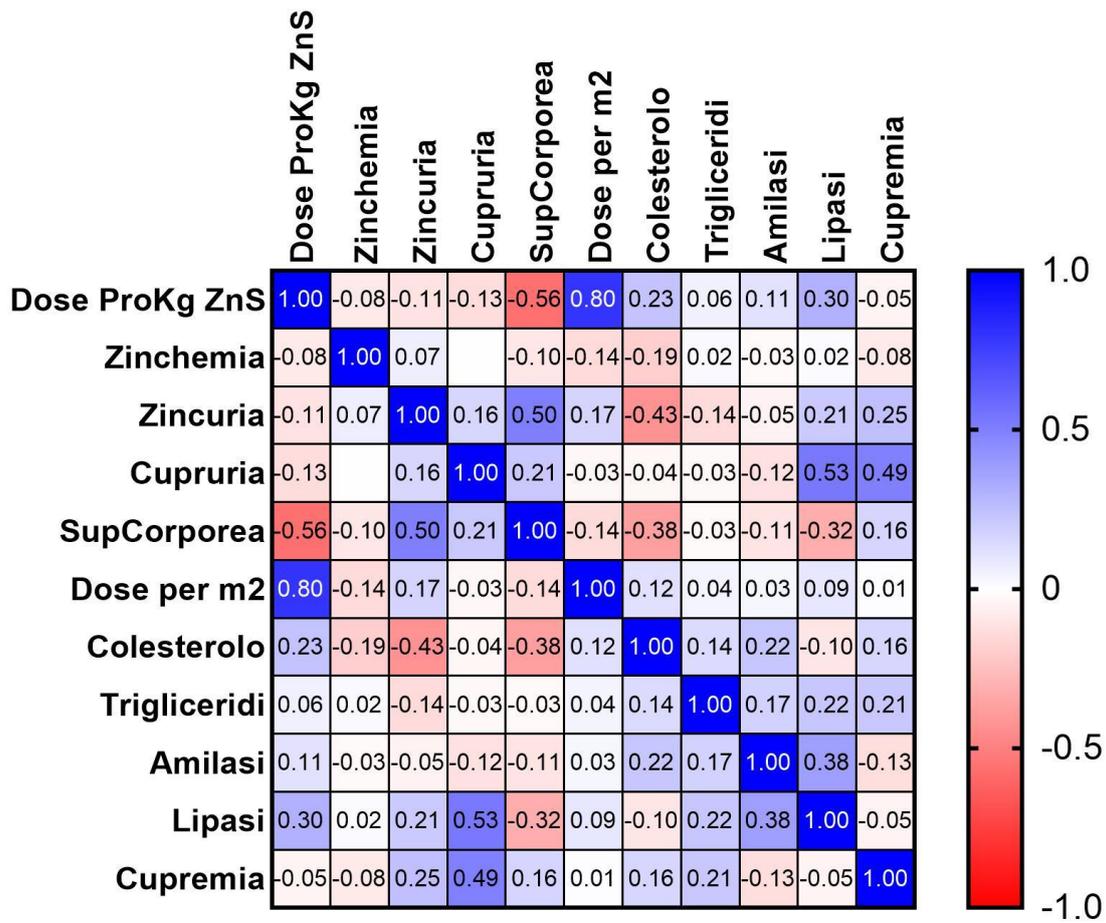


Figura 17. Matrice di correlazione per 181 osservazioni riguardanti il trattamento con zinco solfato.

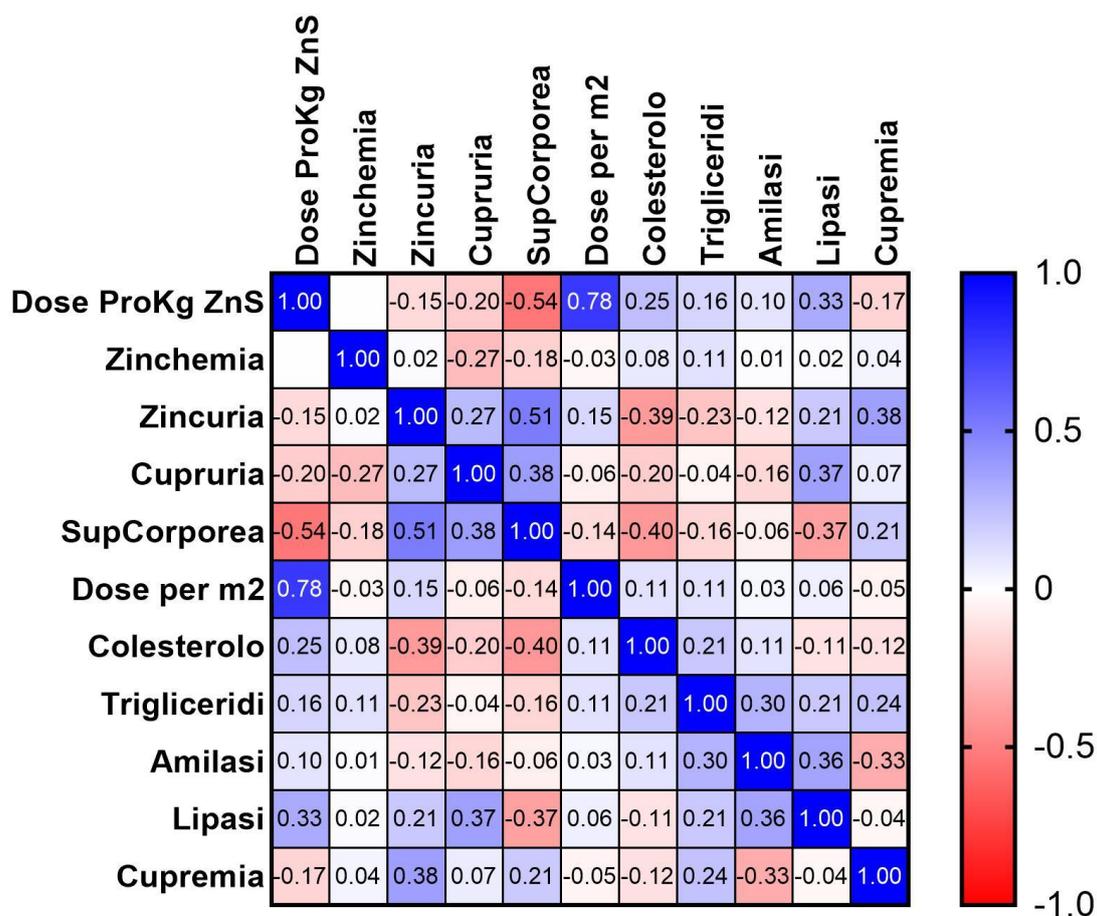


Figura 18. Matrice di correlazione per le sole 117 osservazioni riguardanti il trattamento con zinco solfato in cui è stata evidenziata buona aderenza alla terapia.

Tra le correlazioni significative di maggiore rilievo, nel gruppo delle osservazioni con buona aderenza al trattamento con ZnA, si segnala che la dose pro-Kg mostrava una correlazione diretta con la zinchemia ($p=0.006$) (**Fig.19**), con l'amilasi ($p=0.01$) e con la lipasi ($p=0.003$) (**Fig.20**). Allo stesso modo, la dose per m^2 era positivamente correlata alla zinchemia ($p=0.006$) (**Fig.21**), all'amilasi ($p<0.001$) e alla lipasi ($p<0.001$) (**Fig.22**). La cupruria mostrava una correlazione inversa con la cupremia ($p=0.046$). La zinchemia era direttamente correlata alla lipasi ($p=0.013$), mentre la zincuria inversamente correlata al colesterolo ($p=0.040$). Si confermavano la correlazione positiva tra colesterolo e trigliceridi ($p<0.001$) e tra amilasi e lipasi ($p<0.001$), e quella inversa tra amilasi e cupremia ($p=0.006$).

Nel gruppo delle osservazioni totali in zinco acetato, indipendentemente dalla compliance, restavano significative tutte le precedenti correlazioni: positiva tra dose

pro-Kg e zinchemia ($p=0.044$), amilasi ($p=0.005$) e lipasi ($p<0,001$); positiva tra dose per m^2 e zinchemia ($p=0.015$), amilasi ($p<0.001$) e lipasi ($p<0.001$); inversa tra cupruria e cupremia ($p=0.01$); diretta tra zinchemia e lipasi ($p=0.009$); negativa tra zincuria e colesterolo ($p=0.001$); diretta tra colesterolo e trigliceridi ($p<0.001$), amilasi e lipasi ($p<0.001$); inversa tra amilasi e cupremia ($p=0.013$). In aggiunta, la zinchemia mostrava una correlazione diretta con la zincuria ($p=0.018$); il colesterolo mostrava una correlazione inversa con la cupremia ($p=0.048$); la lipasi mostrava una correlazione inversa con i trigliceridi ($p=0.025$).

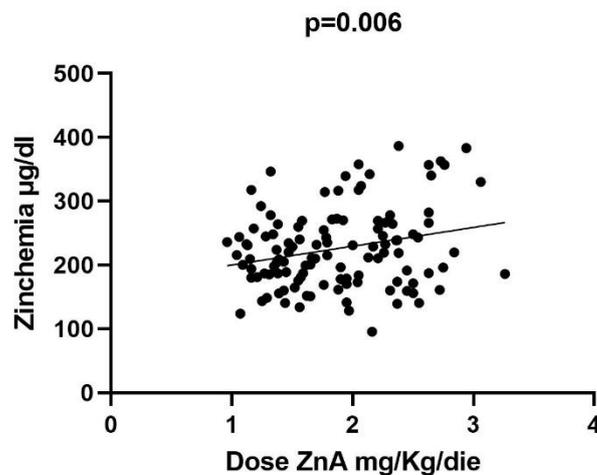


Figura 19. Correlazione diretta tra dose pro-Kg di zinco acetato (ZnA) e zinchemia in 137 osservazioni con buona aderenza al trattamento.

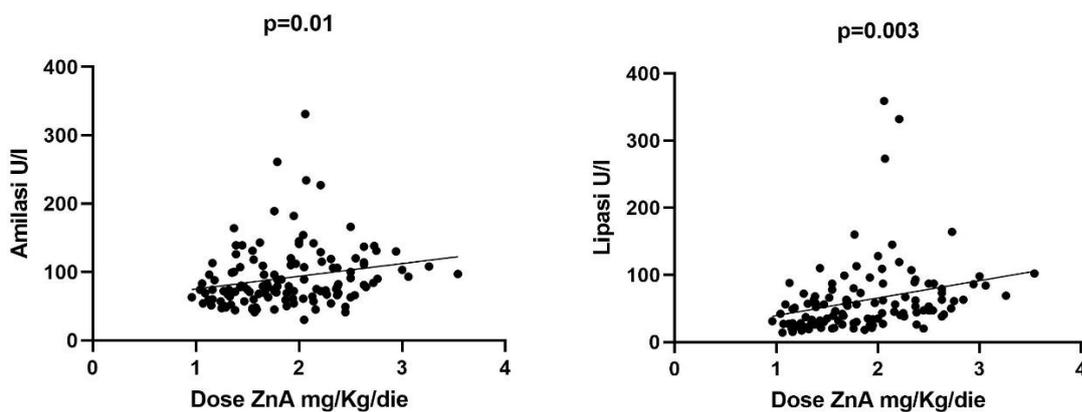


Figura 20. Correlazione diretta tra dose pro-Kg di zinco acetato (ZnA) e amilasi e lipasi sieriche in 137 osservazioni con buona aderenza al trattamento.

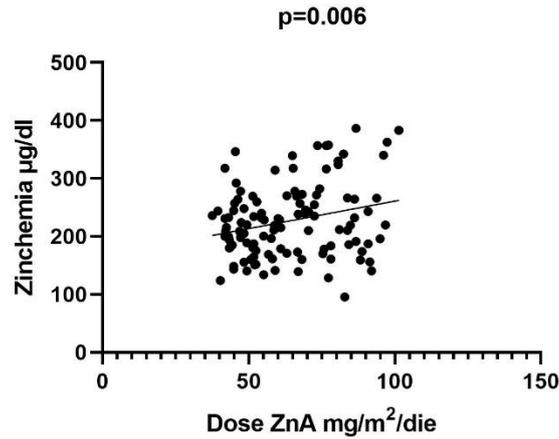


Figura 21. Correlazione diretta tra dose di zinco acetato (ZnA) normalizzata per superficie corporea e zinchemia in 137 osservazioni con buona aderenza al trattamento.

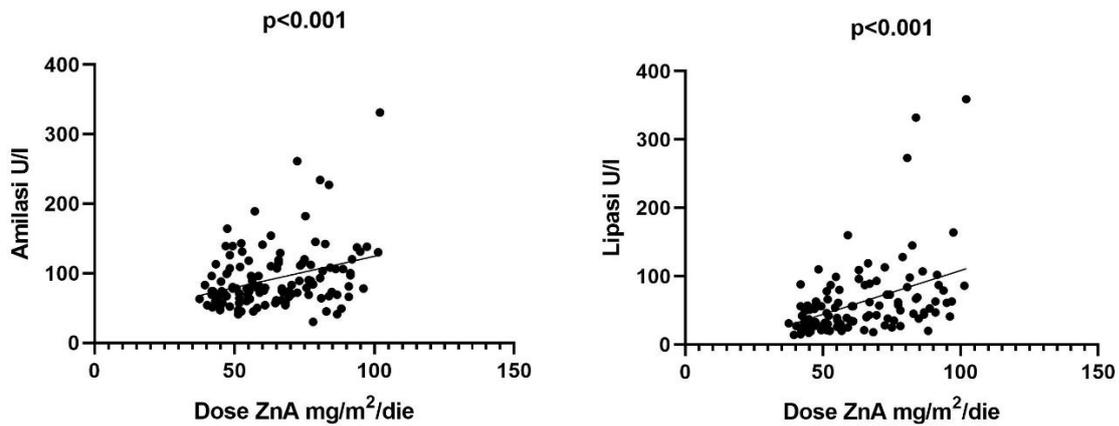


Figura 22. Correlazione diretta tra dose di zinco acetato (ZnA) normalizzata per superficie corporea e amilasi e lipasi sieriche in 137 osservazioni con buona aderenza al trattamento.

Per quanto riguarda il gruppo di osservazioni in ZnS, nell'ambito di quelle con buona aderenza al trattamento, la dose proKg e per m² non risultavano significativamente correlate ai parametri del metabolismo di zinco e rame né agli enzimi pancreatici. La cupruria mostrava una correlazione inversa con la zinchemia (p=0.045), come atteso, e con la zincuria (p=0.006); la zincuria mostrava una correlazione inversa con il colesterolo (p=0.001); i trigliceridi mostravano una correlazione diretta con il colesterolo (p=0.020) e con l'amilasi (p=0.002); il colesterolo mostrava una correlazione diretta con la dose pro-Kg (p=0.007). Nel gruppo dei pazienti totali in terapia con zinco

solfato, indipendentemente dalla compliance, si confermavano le seguenti correlazioni: negativa tra zincuria e colesterolo ($p < 0.001$); diretta tra trigliceridi e amilasi ($p = 0.031$); diretta tra colesterolo e dose proKg ($p = 0.002$). Si riscontravano inoltre correlazioni inverse tra zinchemia e colesterolo ($p = 0.032$), cupruria e lipasi ($p = 0.025$), cupremia e cupruria ($p < 0.001$); correlazioni positive tra amilasi e colesterolo ($p = 0.006$), amilasi e lipasi ($p = 0.049$).

VI.V DISCUSSIONE

Nonostante la rarità della MW, la coorte di pazienti oggetto di studio era costituita da un campione numericamente significativo grazie al PDTA attivo presso la AOU Federico II. Inoltre, era costituita da pazienti per lo più diagnosticati in età pediatrica, trattati per lungo periodo con sali di zinco e con un lungo follow-up mediano, di circa 19 anni. Il 64.6% delle osservazioni di pazienti in terapia con zinco solfato, il 76.9% delle osservazioni dei pazienti in terapia con zinco acetato, ed il 70.7% delle osservazioni complessive dei pazienti in terapia con zinco, sia solfato che acetato, risultavano con buona aderenza al trattamento. Si può quindi dedurre che la coorte di pazienti oggetto di studio, per la maggior parte del follow-up, abbia avuto una buona aderenza alla terapia con zinco.

Nel gruppo delle osservazioni in zinco acetato (totale e solo complianti) si sono riscontrate delle correlazioni dirette tra la dose pro-Kg e i livelli di zinchemia, di amilasi e di lipasi, e tra la dose per m^2 e i livelli di zinchemia, di amilasi e di lipasi. Questi risultati supportano il razionale del presente studio, indicando come peso e superficie corporea possano essere parametri sulla cui base poter stabilire una dose individualizzata del farmaco. Allo stesso tempo, la correlazione diretta con gli enzimi pancreatici sostiene l'ipotesi di una tossicità pancreatica dello zinco acetato dose-dipendente, oltre che la possibilità di utilizzare tali variabili nel monitoraggio terapeutico e nel calcolo del dosaggio, così da massimizzare l'efficacia del farmaco e ridurre gli effetti collaterali. Queste correlazioni non si sono riscontrate invece nel gruppo di osservazioni in zinco solfato (né sul totale, né sul gruppo delle sole con evidenza di buona aderenza). Uno dei motivi può essere rappresentato dalla minore affidabilità delle metodiche di

valutazione di zinchemia, zincuria e cupruria, ai tempi di utilizzo dello zinco solfato e cioè prima del 2004. Altra motivazione potrebbe essere la scarsità dei dati relativi agli enzimi pancreatici nelle osservazioni più datate rispetto alla vasta mole di dati disponibili in quelle degli ultimi 10-15 anni.

L'impatto dose-correlato dello zinco acetato sugli enzimi pancreatici è anche dimostrato dalle differenze statisticamente significative di dose proKg, dose per m² e zinchemia evidenziate tra il sottogruppo con iperenzimemia e quello senza.

Nell'ambito delle analisi effettuate, si sono riscontrate anche delle correlazioni persistenti in più gruppi: la correlazione diretta tra zinchemia e zincuria; la correlazione inversa di zincuria e zinchemia con colesterolo; la correlazione inversa tra cupremia e amilasi; la correlazione diretta tra amilasi e lipasi; la correlazione diretta tra colesterolo e trigliceridi.

Queste correlazioni, diretta tra i valori di lipasi e i livelli di zinchemia e inversa tra i livelli di amilasi e la cupremia, avvalorano ancora di più l'ipotesi che l'iperenzimemia pancreatica non sia un effetto della MW, ma della terapia con zinco. La correlazione inversa tra cupremia e amilasi allo stesso tempo, potrebbe però insinuare il dubbio dell'iperenzimemia come segno di deficit di rame. Tuttavia, la mancata osservazione di correlazioni costanti di amilasi e lipasi con la cupruria indebolisce questa ipotesi.

Altro dato che merita discussione è la correlazione inversa tra zinchemia e zincuria con il colesterolo, e la correlazione diretta tra colesterolo e trigliceridi, che tenderebbero a definire la dislipidemia come associata ad uno scarso controllo dell'epatopatia nei pazienti con MW. Infatti l'aumento del rame intraepatico è stato dimostrato essere associato a steatosi epatica e dislipidemia. Anche in questo caso, però, la letteratura è ancora dibattuta tra l'ipotesi della dislipidemia come segno di mancato controllo della MW o di deficit di rame. A favore di quest'ultima ipotesi vi è la persistente correlazione diretta del colesterolo con la dose proKg di zinco. Tuttavia, i valori significativamente più bassi di colesterolo nelle osservazioni con adeguata compliance, riscontrate sia in pazienti in ZnA che in ZnS, avvalorano l'ipotesi che l'ipercolesterolemia sia segno di uno squilibrio metabolico esistente nel paziente con scarso controllo della patologia.

In conclusione, si può affermare che lo studio ha permesso di identificare in pazienti con MW in terapia con zinco acetato delle variabili quali il peso e la superficie corporea

che possano consentire di personalizzare la terapia. Tali risultati preliminari necessitano sicuramente di essere confermati da studi ulteriori, ma aprono lo scenario a passi successivi come quello di identificare altri fattori come sesso, età, genotipo, che possano essere utili per l'individualizzazione della terapia. Ciò consentirebbe il miglioramento dell'assistenza sin dalla tenera età per i pazienti con MW e una prescrizione farmacologica "tailored" sul paziente, in linea con la medicina di precisione verso cui il mondo scientifico è sempre più orientato.

Capitolo VII

Considerazioni conclusive

Nonostante la MW sia stata identificata nel 1912, ad oltre 100 anni di distanza, molti aspetti sono ancora ignoti o mal definiti. La ricerca scientifica sta velocemente progredendo, accrescendo progressivamente le conoscenze sui meccanismi molecolari e cellulari della patologia e promuovendo la sperimentazione della terapia genica al pari di quanto si verifica per altre malattie monogeniche. Ciononostante, numerose sono le criticità ancora irrisolte, ovviamente maggiormente evidenti nei centri che gestiscono casistiche numerose e per periodi protratti. Tra queste criticità si annoverano: la mancanza di chiari parametri di efficacia su cui gestire la terapia; l'assenza di un definito intervallo di valori in cui tenere i parametri del metabolismo del rame in corso di trattamento; l'assenza di un chiaro consenso sulla necessità di riduzione dell'introito di rame con conseguente impatto sfavorevole sulla qualità di vita; le incertezze sulle capacità riproduttive dei pazienti. L'insieme delle attività di ricerca presentate in questa tesi nascono da una lunga esperienza sulla patologia e da un'ampia casistica gestita da un team multidisciplinare dedicato alla malattia di Wilson. Nel secondo capitolo è stata focalizzata l'attenzione sulle principali questioni irrisolte relative alla gestione terapeutica della malattia con lo scopo di promuovere progetti mirati a migliorare l'assistenza e la qualità di vita dei pazienti affetti da malattia di Wilson.

Nei capitoli successivi è stato affrontato, in particolare, il monitoraggio del paziente wilsoniano, con l'obiettivo di identificare parametri misurabili e standardizzati per modulare il trattamento e contenere gli effetti indesiderati. Inoltre, si è provveduto a mostrare come nel paziente in terapia di mantenimento con zinco non sia necessario compromettere la qualità di vita con una dieta povera di rame.

In conseguenza del generale miglioramento delle condizioni cliniche dei pazienti e della loro soddisfacente sopravvivenza, si è dedicata attenzione alla loro salute riproduttiva attraverso una revisione delle migliori evidenze disponibili e grazie ad uno studio prospettico pilota in collaborazione con i ginecologi del team. Tale studio ha evidenziato come i pazienti precocemente diagnosticati e adeguatamente trattati non presentino un'alterazione del potenziale riproduttivo che invece è compromesso nei non aderenti

al trattamento. Infine, attraverso una valutazione retrospettiva su un ampio numero di pazienti trattati con zinco per un periodo più che decennale, si è avviato un processo teso ad identificare variabili quali il peso o la superficie corporea in base a cui personalizzare la terapia con zinco. Tale studio ha mostrato una correlazione significativa tra le dosi di zinco, normalizzate per peso o superficie corporea, ed i livelli sierici di zinco e degli enzimi pancreatici. È stato in tal modo ipotizzato che l'iperenzimemia pancreatica da zinco sia dose-dipendente e che in futuro si possa individualizzare il trattamento per ciascun paziente.

In definitiva, tutte le ricerche presentate in questa tesi hanno preso spunto dall'analisi di una ampia casistica monocentrica gestita da un team multidisciplinare con un approccio sperimentale e, attraverso il confronto con le migliori evidenze disponibili in letteratura, hanno perseguito l'obiettivo finale di migliorare la gestione assistenziale dei pazienti wilsoniani e la loro qualità di vita.

Capitolo VIII

Bibliografia

1. SAK W. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*. 1912;34(4):295-507.
2. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet*. 2007;369(9559):397-408.
3. Bearn AG. A genetical analysis of thirty families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Ann Hum Genet*. 1960;24:33-43.
4. Sandahl TD, Laursen TL, Munk DE, Vilstrup H, Weiss KH, Ott P. The Prevalence of Wilson's Disease: An Update. *Hepatology*. 2020;71(2):722-32.
5. Zappu A, Magli O, Lepori MB, Dessi V, Diana S, Incollu S, et al. High incidence and allelic homogeneity of Wilson disease in 2 isolated populations: a prerequisite for efficient disease prevention programs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;47(3):334-8.
6. Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;197(1):271-7.
7. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet*. 1993;5(4):344-50.
8. Roelofsen H, Wolters H, Van Luyn MJ, Miura N, Kuipers F, Vonk RJ. Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology*. 2000;119(3):782-93.
9. Linder MC. Copper Homeostasis in Mammals, with Emphasis on Secretion and Excretion. A Review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14).
10. de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet*. 2007;44(11):673-88.
11. Bartee MY, Lutsenko S. Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level. *Biometals*. 2007;20(3-4):627-37.

12. Cater MA, La Fontaine S, Mercer JF. Copper binding to the N-terminal metal-binding sites or the CPC motif is not essential for copper-induced trafficking of the human Wilson protein (ATP7B). *Biochem J.* 2007;401(1):143-53.
13. Holtzman NA, Gaumnitz BM. Studies on the rate of release and turnover of ceruloplasmin and apoceruloplasmin in rat plasma. *J Biol Chem.* 1970;245(9):2354-8.
14. Scheinberg IH, Gitlin D. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science.* 1952;116(3018):484-5.
15. Gitlin JD. Wilson disease. *Gastroenterology.* 2003;125(6):1868-77.
16. Brewer GJ, Yuzbasiyan-Gurkan V. Wilson disease. *Medicine (Baltimore).* 1992;71(3):139-64.
17. Roberts EA, Schilsky ML, American Association for Study of Liver D. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology.* 2008;47(6):2089-111.
18. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut.* 2007;56(1):115-20.
19. Czlonkowska A, Tarnacka B, Litwin T, Gajda J, Rodo M. Wilson's disease-cause of mortality in 164 patients during 1992-2003 observation period. *J Neurol.* 2005;252(6):698-703.
20. Bruha R, Marecek Z, Pospisilova L, Nevsimalova S, Vitek L, Martasek P, et al. Long-term follow-up of Wilson disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver Int.* 2011;31(1):83-91.
21. Schilsky ML, Roberts EA, Bronstein JM, Dhawan A, Hamilton JP, Rivard AM, et al. A Multidisciplinary Approach to the Diagnosis and Management of Wilson Disease: Executive Summary of the 2022 Practice Guidance on Wilson Disease from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2022.
22. Wiebers DO, Hollenhorst RW, Goldstein NP. The ophthalmologic manifestations of Wilson's disease. *Mayo Clin Proc.* 1977;52(7):409-16.
23. Cairns JE, Williams HP, Walshe JM. "Sunflower cataract" in Wilson's disease. *Br Med J.* 1969;3(5662):95-6.
24. Demirkiran M, Jankovic J, Lewis RA, Cox DW. Neurologic presentation of Wilson disease without Kayser-Fleischer rings. *Neurology.* 1996;46(4):1040-3.

25. Giacchino R, Marazzi MG, Barabino A, Fasce L, Ciravegna B, Famularo L, et al. Syndromic variability of Wilson's disease in children. Clinical study of 44 cases. *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 1997;29(2):155-61.
26. Azizi E, Eshel G, Aladjem M. Hypercalciuria and nephrolithiasis as a presenting sign in Wilson disease. *Eur J Pediatr.* 1989;148(6):548-9.
27. Nakada SY, Brown MR, Rabinowitz R. Wilson's disease presenting as symptomatic urolithiasis: a case report and review of the literature. *J Urol.* 1994;152(3):978-9.
28. Chu CC, Huang CC, Chu NS. Recurrent hypokalemic muscle weakness as an initial manifestation of Wilson's disease. *Nephron.* 1996;73(3):477-9.
29. Golding DN, Walshe JM. Arthropathy of Wilson's disease. Study of clinical and radiological features in 32 patients. *Ann Rheum Dis.* 1977;36(2):99-111.
30. Leu ML, Strickland GT, Wang CC, Chen TS. Skin pigmentation in Wilson's disease. *JAMA.* 1970;211(9):1542-3.
31. Carpenter TO, Carnes DL, Jr., Anast CS. Hypoparathyroidism in Wilson's disease. *N Engl J Med.* 1983;309(15):873-7.
32. Klee JG. Undiagnosed Wilson's disease as cause of unexplained miscarriage. *Lancet.* 1979;2(8139):423.
33. Factor SM, Cho S, Sternlieb I, Scheinberg IH, Goldfischer S. The cardiomyopathy of Wilson's disease. Myocardial alterations in nine cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1982;397(3):301-11.
34. Weizman Z, Picard E, Barki Y, Moses S. Wilson's disease associated with pancreatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1988;7(6):931-3.
35. Saito T. Presenting symptoms and natural history of Wilson disease. *Eur J Pediatr.* 1987;146(3):261-5.
36. Iorio R, D'Ambrosi M, Mazzarella G, Varrella F, Vecchione R, Vegnente A. Early occurrence of hypertransaminasemia in a 13-month-old child with Wilson disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;36(5):637-8.
37. Iorio R, Sepe A, Giannattasio A, Cirillo F, Vegnente A. Hypertransaminasemia in childhood as a marker of genetic liver disorders. *J Gastroenterol.* 2005;40(8):820-6.

38. Machado A, Chien HF, Deguti MM, Cancado E, Azevedo RS, Scaff M, et al. Neurological manifestations in Wilson's disease: Report of 119 cases. *Mov Disord.* 2006;21(12):2192-6.
39. Oder W, Grimm G, Kollegger H, Ferenci P, Schneider B, Deecke L. Neurological and neuropsychiatric spectrum of Wilson's disease: a prospective study of 45 cases. *J Neurol.* 1991;238(5):281-7.
40. Oder W, Prayer L, Grimm G, Spatt J, Ferenci P, Kollegger H, et al. Wilson's disease: evidence of subgroups derived from clinical findings and brain lesions. *Neurology.* 1993;43(1):120-4.
41. O'Connor JA, Sokol RJ. Copper metabolism and copper storage disorders. In: Suchy FJ SR, Balistreri WF., editor. *Liver diseases in children* New York, NY USA, Cambridge University Press.2007. p. 626-59.
42. European Association for Study of L. *EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease.* *J Hepatol.* 2012;56(3):671-85.
43. Nagral A, Sarma MS, Matthai J, Kukkle PL, Devarbhavi H, Sinha S, et al. *Wilson's Disease: Clinical Practice Guidelines of the Indian National Association for Study of the Liver, the Indian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, and the Movement Disorders Society of India.* *J Clin Exp Hepatol.* 2019;9(1):74-98.
44. Socha P, Janczyk W, Dhawan A, Baumann U, D'Antiga L, Tanner S, et al. *Wilson's Disease in Children: A Position Paper by the Hepatology Committee of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.* *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66(2):334-44.
45. Shribman S, Marjot T, Sharif A, Vimalasvaran S, Ala A, Alexander G, et al. *Investigation and management of Wilson's disease: a practical guide from the British Association for the Study of the Liver.* *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2022;7(6):560-75.
46. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, et al. *Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease.* *Liver Int.* 2003;23(3):139-42.
47. Koppikar S, Dhawan A. *Evaluation of the scoring system for the diagnosis of Wilson's disease in children.* *Liver Int.* 2005;25(3):680-1.

48. Di Giorgio A, Bartolini E, Calvo PL, Cananzi M, Cirillo F, Della Corte C, et al. Diagnostic Approach to Acute Liver Failure in Children: A Position Paper by the SIGENP Liver Disease Working Group. *Dig Liver Dis.* 2021;53(5):545-57.
49. Gaffney D, Fell GS, O'Reilly DS. ACP Best Practice No 163. Wilson's disease: acute and presymptomatic laboratory diagnosis and monitoring. *J Clin Pathol.* 2000;53(11):807-12.
50. Scheinberg IH, Sternlieb I. *Wilson's Disease.* Philadelphia: W.B. Saunders; 1984.
51. Mak CM, Lam CW, Tam S. Diagnostic accuracy of serum ceruloplasmin in Wilson disease: determination of sensitivity and specificity by ROC curve analysis among ATP7B-genotyped subjects. *Clin Chem.* 2008;54(8):1356-62.
52. Nicastro E, Ranucci G, Vajro P, Vegnente A, Iorio R. Re-evaluation of the diagnostic criteria for Wilson disease in children with mild liver disease. *Hepatology.* 2010;52(6):1948-56.
53. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, et al. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology.* 1997;113(1):212-8.
54. Tanner S. Disorders of copper metabolism. In: Kelly DA, editor. *Diseases of the liver and biliary system in children: Blackwell Science Ltd; 2008.* p. 328-47.
55. Martins da Costa C, Baldwin D, Portmann B, Lolin Y, Mowat AP, Mieli-Vergani G. Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease. *Hepatology.* 1992;15(4):609-15.
56. Muller T, Koppikar S, Taylor RM, Carragher F, Schlenck B, Heinz-Erian P, et al. Re-evaluation of the penicillamine challenge test in the diagnosis of Wilson's disease in children. *J Hepatol.* 2007;47(2):270-6.
57. Alqahtani SA, Chami R, Abuquteish D, Vandriel SM, Yap C, Kukkadi L, et al. Hepatic ultrastructural features distinguish paediatric Wilson disease from NAFLD and autoimmune hepatitis. *Liver Int.* 2022;42(11):2482-91.
58. Zischka H, Einer C. Mitochondrial copper homeostasis and its derailment in Wilson disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;102:71-5.

59. Sternlieb I, Feldmann G. Effects of anticopper therapy on hepatocellular mitochondria in patients with Wilson's disease: an ultrastructural and stereological study. *Gastroenterology*. 1976;71(3):457-61.
60. Hayashi H, Sternlieb I. Lipolysosomes in human hepatocytes. Ultrastructural and cytochemical studies of patients with Wilson's disease. *Lab Invest*. 1975;33(1):1-7.
61. Lyon TD, Fell GS, Gaffney D, McGaw BA, Russell RI, Park RH, et al. Use of a stable copper isotope (^{65}Cu) in the differential diagnosis of Wilson's disease. *Clin Sci (Lond)*. 1995;88(6):727-32.
62. Thomas GR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. Haplotypes and mutations in Wilson disease. *Am J Hum Genet*. 1995;56(6):1315-9.
63. Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, et al. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (*ATP7B*): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet*. 1997;61(2):317-28.
64. Maier-Dobersberger T, Mannhalter C, Rack S, Granditsch G, Kaserer K, Korninger L, et al. Diagnosis of Wilson's disease in an asymptomatic sibling by DNA linkage analysis. *Gastroenterology*. 1995;109(6):2015-8.
65. Loudianos G, Dessi V, Angius A, Lovicu M, Loi A, Deiana M, et al. Wilson disease mutations associated with uncommon haplotypes in Mediterranean patients. *Hum Genet*. 1996;98(6):640-2.
66. Nicastro E, Loudianos G, Zancan L, D'Antiga L, Maggiore G, Marcellini M, et al. Genotype-phenotype correlation in Italian children with Wilson's disease. *J Hepatol*. 2009;50(3):555-61.
67. Stapelbroek JM, Bollen CW, van Amstel JK, van Erpecum KJ, van Hattum J, van den Berg LH, et al. The H1069Q mutation in *ATP7B* is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J Hepatol*. 2004;41(5):758-63.
68. Walshe JM. Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Am J Med*. 1956;21(4):487-95.
69. Walshe JM. Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride. *Lancet*. 1982;1(8273):643-7.

70. Brewer GJ, Hill GM, Prasad AS, Cossack ZT, Rabbani P. Oral zinc therapy for Wilson's disease. *Ann Intern Med.* 1983;99(3):314-9.
71. Cumings JN. The effects of B.A.L. in hepatolenticular degeneration. *Brain.* 1951;74(1):10-22.
72. Denny-Brown D, Porter H. The effect of BAL (2,3-dimercaptopropanol) on hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *N Engl J Med.* 1951;245(24):917-25.
73. McQuaid A, Lamand M, Mason J. The interactions of penicillamine with copper in vivo and the effect on hepatic metallothionein levels and copper/zinc distribution: the implications for Wilson's disease and arthritis therapy. *J Lab Clin Med.* 1992;119(6):744-50.
74. Sini M, Sorbello O, Sanna F, Battolu F, Civolani A, Fanni D, et al. Histologic evolution and long-term outcome of Wilson's disease: results of a single-center experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013;25(1):111-7.
75. Falkmer S, Samuelson G, Sjolín S. Penicillamine-induced normalization of clinical signs, and liver morphology and histochemistry in a case of Wilson's disease. *Pediatrics.* 1970;45(2):260-8.
76. Iorio R, D'Ambrosi M, Marcellini M, Barbera C, Maggiore G, Zancan L, et al. Serum transaminases in children with Wilson's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;39(4):331-6.
77. Manolaki N, Nikolopoulou G, Daikos GL, Panagiotakaki E, Tzetis M, Roma E, et al. Wilson disease in children: analysis of 57 cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48(1):72-7.
78. Dhawan A, Taylor RM, Cheeseman P, De Silva P, Katsiyiannakis L, Mieli-Vergani G. Wilson's disease in children: 37-year experience and revised King's score for liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005;11(4):441-8.
79. Ranucci G, Di Dato F, Leone F, Vajro P, Spagnuolo MI, Iorio R. Penicillamine-induced Elastosis Perforans Serpiginosa in Wilson Disease: Is Useful Switching to Zinc? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;64(3):e72-e3.
80. Brewer GJ, Terry CA, Aisen AM, Hill GM. Worsening of neurologic syndrome in patients with Wilson's disease with initial penicillamine therapy. *Arch Neurol.* 1987;44(5):490-3.

81. Schuna A, Osman MA, Patel RB, Welling PG, Sundstrom WR. Influence of food on the bioavailability of penicillamine. *J Rheumatol.* 1983;10(1):95-7.
82. Van Caillie-Bertrand M, Degenhart HJ, Luijendijk I, Bouquet J, Sinaasappel M. Wilson's disease: assessment of D-penicillamine treatment. *Arch Dis Child.* 1985;60(7):652-5.
83. Saito H, Watanabe K, Sahara M, Mochizuki R, Edo K, Ohyama Y. Triethylene-tetramine (trien) therapy for Wilson's disease. *Tohoku J Exp Med.* 1991;164(1):29-35.
84. Park HK, Lee JH, Lee MC, Chung SJ. Teaching NeuroImages: MRI reversal in Wilson disease with trientine treatment. *Neurology.* 2010;74(17):e72.
85. Brewer GJ, Askari F, Lorincz MT, Carlson M, Schilsky M, Kluin KJ, et al. Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate: IV. Comparison of tetrathiomolybdate and trientine in a double-blind study of treatment of the neurologic presentation of Wilson disease. *Arch Neurol.* 2006;63(4):521-7.
86. Arnon R, Calderon JF, Schilsky M, Emre S, Shneider BL. Wilson disease in children: serum aminotransferases and urinary copper on triethylene tetramine dihydrochloride (trientine) treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;44(5):596-602.
87. Schilsky ML, Blank RR, Czaja MJ, Zern MA, Scheinberg IH, Stockert RJ, et al. Hepatocellular copper toxicity and its attenuation by zinc. *J Clin Invest.* 1989;84(5):1562-8.
88. Brewer GJ. Zinc therapy induction of intestinal metallothionein in Wilson's disease. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(2):301-2.
89. Yuzbasiyan-Gurkan V, Grider A, Nostrant T, Cousins RJ, Brewer GJ. Treatment of Wilson's disease with zinc: X. Intestinal metallothionein induction. *J Lab Clin Med.* 1992;120(3):380-6.
90. Friedman LS, Yarze JC. Zinc in the treatment of Wilson's disease: how it works. *Gastroenterology.* 1993;104(5):1566-8.
91. Brewer GJ. Zinc acetate for the treatment of Wilson's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2001;2(9):1473-7.
92. Brewer GJ, Yuzbasiyan-Gurkan V, Johnson V, Dick RD, Wang Y. Treatment of Wilson's disease with zinc XII: dose regimen requirements. *Am J Med Sci.* 1993;305(4):199-202.

93. Camarata MA, Ala A, Schilsky ML. Zinc Maintenance Therapy for Wilson Disease: A Comparison Between Zinc Acetate and Alternative Zinc Preparations. *Hepatol Commun.* 2019;3(8):1151-8.
94. Brewer GJ, Johnson V, Kaplan J. Treatment of Wilson's disease with zinc: XIV. Studies of the effect of zinc on lymphocyte function. *J Lab Clin Med.* 1997;129(6):649-52.
95. Yuzbasiyan-Gurkan V, Brewer GJ, Abrams GD, Main B, Giacherio D. Treatment of Wilson's disease with zinc. V. Changes in serum levels of lipase, amylase, and alkaline phosphatase in patients with Wilson's disease. *J Lab Clin Med.* 1989;114(5):520-6.
96. Brewer GJ, Hill G, Prasad A, Dick R. The treatment of Wilson's disease with zinc. IV. Efficacy monitoring using urine and plasma copper. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1987;184(4):446-55.
97. Brewer GJ, Dick RD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Johnson V, Wang Y. Treatment of Wilson's disease with zinc. XIII: Therapy with zinc in presymptomatic patients from the time of diagnosis. *J Lab Clin Med.* 1994;123(6):849-58.
98. Hill GM, Brewer GJ, Prasad AS, Hydrick CR, Hartmann DE. Treatment of Wilson's disease with zinc. I. Oral zinc therapy regimens. *Hepatology.* 1987;7(3):522-8.
99. Brewer GJ, Dick RD, Johnson VD, Fink JK, Kluin KJ, Daniels S. Treatment of Wilson's disease with zinc XVI: treatment during the pediatric years. *J Lab Clin Med.* 2001;137(3):191-8.
100. Brewer GJ, Dick RD, Johnson VD, Brunberg JA, Kluin KJ, Fink JK. Treatment of Wilson's disease with zinc: XV long-term follow-up studies. *J Lab Clin Med.* 1998;132(4):264-78.
101. Hoogenraad TU. Paradigm shift in treatment of Wilson's disease: zinc therapy now treatment of choice. *Brain Dev.* 2006;28(3):141-6.
102. Hoogenraad TU, Koevoet R, de Ruyter Korver EG. Oral zinc sulphate as long-term treatment in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Eur Neurol.* 1979;18(3):205-11.

103. Esmaeli B, Burnstine MA, Martonyi CL, Sugar A, Johnson V, Brewer GJ. Regression of Kayser-Fleischer rings during oral zinc therapy: correlation with systemic manifestations of Wilson's disease. *Cornea*. 1996;15(6):582-8.
104. Czlonkowska A, Gajda J, Rodo M. Effects of long-term treatment in Wilson's disease with D-penicillamine and zinc sulphate. *J Neurol*. 1996;243(3):269-73.
105. Marcellini M, Di Ciommo V, Callea F, Devito R, Comparcola D, Sartorelli MR, et al. Treatment of Wilson's disease with zinc from the time of diagnosis in pediatric patients: a single-hospital, 10-year follow-up study. *J Lab Clin Med*. 2005;145(3):139-43.
106. Askari FK, Greenson J, Dick RD, Johnson VD, Brewer GJ. Treatment of Wilson's disease with zinc. XVIII. Initial treatment of the hepatic decompensation presentation with trientine and zinc. *J Lab Clin Med*. 2003;142(6):385-90.
107. Lee VD, Northup PG, Berg CL. Resolution of decompensated cirrhosis from Wilson's disease with zinc monotherapy: a potential therapeutic option? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(8):1069-71.
108. Weiss KH, Gotthardt DN, Klemm D, Merle U, Ferenci-Foerster D, Schaefer M, et al. Zinc monotherapy is not as effective as chelating agents in treatment of Wilson disease. *Gastroenterology*. 2011;140(4):1189-98 e1.
109. Ranucci G, Di Dato F, Spagnuolo MI, Vajro P, Iorio R. Zinc monotherapy is effective in Wilson's disease patients with mild liver disease diagnosed in childhood: a retrospective study. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:41.
110. Dubbioso R, Ranucci G, Esposito M, Di Dato F, Topa A, Quarantelli M, et al. Subclinical neurological involvement does not develop if Wilson's disease is treated early. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016;24:15-9.
111. Brewer GJ, Yuzbasiyan-Gurkan V, Johnson V, Dick RD, Wang Y. Treatment of Wilson's disease with zinc: XI. Interaction with other anticopper agents. *J Am Coll Nutr*. 1993;12(1):26-30.
112. Brewer GJ, Dick RD, Johnson V, Wang Y, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kluin K, et al. Treatment of Wilson's disease with ammonium tetrathiomolybdate. I. Initial therapy in 17 neurologically affected patients. *Arch Neurol*. 1994;51(6):545-54.

113. Fryer MJ. Potential of vitamin E as an antioxidant adjunct in Wilson's disease. *Med Hypotheses*. 2009;73(6):1029-30.
114. Shen L, Ji HF. Adjunctive vitamin E treatment in Wilson disease and suggestions for future trials. *Hepatology*. 2010;51(5):1864; author reply -5.
115. von Herbay A, de Groot H, Hegi U, Stremmel W, Strohmeyer G, Sies H. Low vitamin E content in plasma of patients with alcoholic liver disease, hemochromatosis and Wilson's disease. *J Hepatol*. 1994;20(1):41-6.
116. Sokol RJ, Devereaux M, Mierau GW, Hambidge KM, Shikes RH. Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. Modification by vitamin E deficiency. *Gastroenterology*. 1990;99(4):1061-71.
117. Sokol RJ, McKim JM, Jr., Devereaux MW. alpha-tocopherol ameliorates oxidant injury in isolated copper-overloaded rat hepatocytes. *Pediatr Res*. 1996;39(2):259-63.
118. Kalita J, Kumar V, Misra UK, Parashar V, Ranjan A. Adjunctive Antioxidant Therapy in Neurologic Wilson's Disease Improves the Outcomes. *J Mol Neurosci*. 2020;70(3):378-85.
119. van den Berghe PV, Stapelbroek JM, Krieger E, de Bie P, van de Graaf SF, de Groot RE, et al. Reduced expression of ATP7B affected by Wilson disease-causing mutations is rescued by pharmacological folding chaperones 4-phenylbutyrate and curcumin. *Hepatology*. 2009;50(6):1783-95.
120. Ranucci G, Polishchuck R, Iorio R. Wilson's disease: Prospective developments towards new therapies. *World J Gastroenterol*. 2017;23(30):5451-6.
121. Cortese A, Zangaglia R, Lozza A, Piccolo G, Pacchetti C. Copper deficiency in Wilson's disease: peripheral neuropathy and myelodysplastic syndrome complicating zinc treatment. *Mov Disord*. 2011;26(7):1361-2.
122. Dziezyc K, Litwin T, Sobanska A, Czlonkowska A. Symptomatic copper deficiency in three Wilson's disease patients treated with zinc sulphate. *Neurol Neurochir Pol*. 2014;48(3):214-8.
123. Roberts EA, Schilsky ML, Division of G, Nutrition HfSCTOC. A practice guideline on Wilson disease. *Hepatology*. 2003;37(6):1475-92.

124. Sturm E, Piersma FE, Tanner MS, Socha P, Roberts EA, Shneider BL. Controversies and Variation in Diagnosing and Treating Children With Wilson Disease: Results of an International Survey. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016;63(1):82-7.
125. Appenzeller-Herzog C, Mathes T, Heeres MLS, Weiss KH, Houwen RHJ, Ewald H. Comparative effectiveness of common therapies for Wilson disease: A systematic review and meta-analysis of controlled studies. *Liver Int.* 2019;39(11):2136-52.
126. Mohr I, Weiss KH. Current anti-copper therapies in management of Wilson disease. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 2):S69.
127. Czlonkowska A, Litwin T, Karlinski M, Dziezyc K, Chabik G, Czerska M. D-penicillamine versus zinc sulfate as first-line therapy for Wilson's disease. *Eur J Neurol.* 2014;21(4):599-606.
128. Chen JC, Chuang CH, Wang JD, Wang CW. Combination Therapy Using Chelating Agent and Zinc for Wilson's Disease. *J Med Biol Eng.* 2015;35(6):697-708.
129. Dziezyc K, Litwin T, Chabik G, Czlonkowska A. Measurement of urinary copper excretion after 48-h d-penicillamine cessation as a compliance assessment in Wilson's disease. *Funct Neurol.* 2015;30(4):264-8.
130. Teufel-Schafer U, Forster C, Schaefer N. Low Copper Diet-A Therapeutic Option for Wilson Disease? *Children (Basel).* 2022;9(8).
131. Russell K, Gillanders LK, Orr DW, Plank LD. Dietary copper restriction in Wilson's disease. *Eur J Clin Nutr.* 2018;72(3):326-31.
132. Mustafa SK, AlSharif MA. Copper (Cu) an Essential Redox-Active Transition Metal in Living System—A Review Article. *American Journal of Analytical Chemistry.* 2018;9:15-26.
133. Tarnacka B, Rodo M, Cichy S, Czlonkowska A. Procreation ability in Wilson's disease. *Acta Neurol Scand.* 2000;101(6):395-8.
134. Kaushansky A, Frydman M, Kaufman H, Homburg R. Endocrine studies of the ovulatory disturbances in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Fertil Steril.* 1987;47(2):270-3.
135. Malik A, Khawaja A, Sheikh L. Wilson's disease in pregnancy: case series and review of literature. *BMC Res Notes.* 2013;6:421.

136. Frikha R, Abdelmoula NB, Rebai T. Wilson disease, genotype and infertility: is there a correlation? *Endocrine*. 2013;44(1):266-7.
137. Houwen RH, van Hattum J, Hoogenraad TU. Wilson disease. *Neth J Med*. 1993;43(1-2):26-37.
138. Pfeiffenberger J, Beinhardt S, Gotthardt DN, Haag N, Freissmuth C, Reuner U, et al. Pregnancy in Wilson's disease: Management and outcome. *Hepatology*. 2018;67(4):1261-9.
139. Matsubayashi H, Kitaya K, Yamaguchi K, Nishiyama R, Takaya Y, Ishikawa T. Is a high serum copper concentration a risk factor for implantation failure? *BMC Res Notes*. 2017;10(1):387.
140. Dathe K, Beck E, Schaefer C. Pregnancy outcome after chelation therapy in Wilson disease. Evaluation of the German Embryotox Database. *Reprod Toxicol*. 2016;65:39-45.
141. Reuner U, Dinger J. Pregnancy and Wilson disease: management and outcome of mother and newborns-experiences of a perinatal centre. *Ann Transl Med*. 2019;7(Suppl 2):S56.
142. Sinha S, Taly AB, Prashanth LK, Arunodaya GR, Swamy HS. Successful pregnancies and abortions in symptomatic and asymptomatic Wilson's disease. *J Neurol Sci*. 2004;217(1):37-40.
143. Czlonkowska A, Gromadzka G, Buttner J, Chabik G. Clinical features of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count syndrome in undiagnosed Wilson disease: report of two cases. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;281(1):129-34.
144. Brewer GJ, Johnson VD, Dick RD, Hedera P, Fink JK, Kluin KJ. Treatment of Wilson's disease with zinc. XVII: treatment during pregnancy. *Hepatology*. 2000;31(2):364-70.
145. Keen CL, Mark-Savage P, Lonnerdal B, Hurley LS. Teratogenic effects of D-penicillamine in rats: relation to copper deficiency. *Drug Nutr Interact*. 1983;2(1):17-34.
146. Keen CL, Uriu-Hare JY, Hawk SN, Jankowski MA, Daston GP, Kwik-Urbe CL, et al. Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr*. 1998;67(5 Suppl):1003S-11S.

147. Cohen NL, Keen CL, Lonnerdal B, Hurley LS. The effect of copper supplementation on the teratogenic effects of triethylenetetramine in rats. *Drug Nutr Interact.* 1983;2(3):203-10.
148. Nagasaka H, Inoue I, Inui A, Komatsu H, Sogo T, Murayama K, et al. Relationship between oxidative stress and antioxidant systems in the liver of patients with Wilson disease: hepatic manifestation in Wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress. *Pediatr Res.* 2006;60(4):472-7.
149. Minami T, Shimane M, Tanaka H, Namikawa K, Ichida S. Pancreatic exocrine damage induced by subcutaneous injection of a low dosage of zinc. *Biol Trace Elem Res.* 2001;84(1-3):169-79.
150. Plum LM, Rink L, Haase H. The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(4):1342-65.
151. Komatsu T, Sugie K, Inukai N, Eguchi O, Oyamada T, Sawada H, et al. Chronic pancreatitis in farmed pigs fed excessive zinc oxide. *J Vet Diagn Invest.* 2020;32(5):689-94.

Capitolo IX

Lavori in extenso internazionali degli ultimi tre anni

(Novembre 2019 – Ottobre 2022)

1. Rossi A, **Di Dato F**, Iorio R, Vallone G, Mollica C, Caprio MG, De Ville De Goyet J, Spagnuolo MI. Case report: horse or zebra, ascites or pseudo-ascites? Care for pictural details! BMC Pediatr 2019 Nov; 19(1):460.
2. Ferrazzano GF, Sangianantoni G, Desiderio F, Ingenito A, Iorio R, **Di Dato F**, Matarazzo M, Cantile T. Oral health conditions in Wilson's disease patients: A clinical diagnostic study. Eur J Paediatr Dent. 2020 Jun;21:137-142.
3. Caruso M, Cuocolo R, **Di Dato F**, Mollica C, Vallone G, Romeo V, Petretta M, Liuzzi R, Mainenti P, Iorio R, Brunetti A, Maurea S. Ultrasound, shear-wave elastography, and magnetic resonance imaging in native liver survivor patients with biliary atresia after Kasai portoenterostomy: correlation with medical outcome after treatment. Acta Radiol 2020 Oct;61(10):1300-1308.
4. Lo Vecchio A, Basile FW, Bruzzese D, **Di Dato F**, Aol P, Omona V, Smarrazzo A, Guarino A. Diarrhea in Children with Plasmodium falciparum Malaria: A Case-Control Study on the Prevalence and Response to Antimalarial Treatment. Am J Trop Med Hyg 2020 Dec;104(2):659-665. doi: 10.4269/ajtmh.20-0287.
5. Iorio GG, Conforti A, Vallone R, Carbone L, Matarazzo M, De Rosa A, De Rosa P, Picarelli S, Fedele F, Perruolo G, Formisano P, Iorio R, Alviggi C, **Di Dato F**. Reproductive function of long-term treated patients with hepatic onset of Wilson's disease: a prospective study. Reprod Biomed Online 2021 Apr;42:835-841. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.12.012.

6. Serranti D, Nebbia G, Cananzi M, Nicastro E, **Di Dato F**, Nuti F, Garazzino S, Silvestro E, Giacomet V, Forlanini F, Pinon M, Calvo PL, Riva S, Dodi I, Cangelosi AM, Antonucci R, Ricci S, Bartolini E, Mastrangelo G, Trapani S, Lenge M, Gaio P, Vajro P, Iorio R, D'Antiga L, Indolfi G. Efficacy of Sofosbuvir/Ledipasvir in Adolescents With Chronic Hepatitis C Genotypes 1, 3, and 4: A Real-world Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2021 Jan;72:95-100.
7. **Di Dato F**, Iorio R. Wilson disease: Many guidelines but still many unsolved doubts. *Dig Liver Dis* 2021 Jan;53(1):139-140. doi: 10.1016/j.dld.2020.11.002.
8. **Di Dato F**, Ranucci G, de Ville de Goyet J, Alberti D, Iorio R. Unusual Clinical Course for Untreated Malformative Biliary Atresia Infant: Is Portal Hypertension an Important Driver of Liver Fibrosis? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2021 Feb;72:216-219.
9. Caruso M, **Di Dato F**, Mollica C, Vallone G, Romeo V, Liuzzi R, Mainenti PP, Petretta M, Iorio R, Brunetti A, Maurea S. Imaging prediction with ultrasound and MRI of long-term medical outcome in native liver survivor patients with biliary atresia after kasai portoenterostomy: a pilot study. *Abdom Radiol (NY)* 2021 Jun;46:2595-2603. doi: 10.1007/s00261-021-02958-4.
10. Tan NB, Pagnamenta AT, Ferla MP, Gadian J, Chung BH, Chan MC, Fung JL, Cook E, Guter S, Boschann F, Heinen A, Schallner J, Mignot C, Keren B, Whalen S, Sarret C, Mittag D, Demmer L, Stapleton R, Saida K, Matsumoto N, Miyake N, Sheffer R, Mor-Shaked H, Barnett CP, Byrne AB, Scott HS, Kraus A, Cappuccio G, Brunetti-Pierrri N, Iorio R, **Di Dato F**, Pais LS, Yeung A, Tan TY, Taylor JC, Christodoulou J, White SM. Recurrent de novo missense variants in GNB2 can cause syndromic intellectual disability. *J Med Genet* 2022 May;59:511-516. doi: 10.1136/jmedgenet-2020-107462.
11. Caruso M, Ricciardi C, Delli Paoli G, **Di Dato F**, Donisi L, Romeo V, Petretta M, Iorio R, Cesarelli G, Brunetti A, Maurea S. Machine Learning Evaluation of Biliary

Atresia Patients to Predict Long-Term Outcome after the Kasai Procedure. *Bioengineering (Basel)* 2021 Oct;8:152. doi: 10.3390/bioengineering8110152.

12. Ranucci G, **Di Dato F**, Liccardo D, Spada M, Maggiore G, Iorio R. An Unexpected Hepatic Hydrothorax After a Successful Kasai Portoenterostomy: A Case Report. *Front Pediatr* 2021 Nov;9:766187. doi: 10.3389/fped.2021.766187.

13. **Di Dato F**, Capalbo D, Mirra R, Del Vecchio Blanco F, Salerno M, Iorio R. Case Report: Neonatal Cholestasis as Early Manifestation of Primary Adrenal Insufficiency. *Front Pediatr* 2021 Nov;9:767858. doi: 10.3389/fped.2021.767858.

14. Ranucci G, Della Corte C, Alberti D, Bondioni MP, Boroni G, Calvo PL, Cananzi M, Candusso M, Clemente MG, D'Antiga L, Degrassi I, De Ville De Goyet J, **Di Dato F**, Di Giorgio A, Vici CD, Ferrari F, Francalanci P, Fuoti M, Fusaro F, Gaio P, Grimaldi C, Iascone M, Indolfi G, Iorio R, Maggiore G, Mandato C, Matarazzo L, Monti L, Mosca F, Nebbia G, Nuti F, Paoletta G, Pinon M, Roggero P, Sciveres M, Serranti D, Spada M, Vajro P, Nicastro E. Diagnostic approach to neonatal and infantile cholestasis: A position paper by the SIGENP liver disease working group. *Dig Liver Dis* 2022 Jan;54:40-53. doi: 10.1016/j.dld.2021.09.011.

15. D'Amico A, Perillo T, Cuocolo R, Uggla L, **Di Dato F**, Caranci F, Iorio R. Neuroradiological findings in Alagille syndrome. *Br J Radiol* 2022 Jan;95:20201241. doi: 10.1259/bjr.20201241.

16. Palmieri GR, De Michele G, Matarazzo M, **Di Dato F**, Perillo S, Dello Iacovo DCP, Cuomo N, Pane C, Russo CV, Iorio R, De Michele G, De Rosa A. Prevalence and features of non-motor symptoms in Wilson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2022 Jan;95:103-106. doi: 10.1016/j.parkreldis.2022.01.016.

17. Giacobbe C, **Di Dato F**, Palma D, Amitrano M, Iorio R, Fortunato G. Rare variants in PKHD1 associated with Caroli syndrome: Two case reports. *Mol Genet Genomic Med* 2022 Aug;10:e1998. doi: 10.1002/mgg3.1998.

18. **Di Dato F**, Di Giorgio A, Mandato C, Maggiore G, Iorio R; SIGENP Acute Hepatitis Group. Italian children seem to be spared from the mysterious severe acute hepatitis outbreak: A report by SIGENP Acute Hepatitis Group. *J Hepatol* 2022 Oct;77:1211-1213. doi: 10.1016/j.jhep.2022.06.026.

19. **Di Dato F**, Iorio R, Spagnuolo MI. IFALD in children: What's new? A narrative review. *Front Nutr* 2022 Jul;9:928371. doi: 10.3389/fnut.2022.928371.

20. Vasco A, **Di Dato F**, Sierchio L, Iorio R, Savoia M. Detection of a monoclonal component after pediatric liver transplantation: a case report. *Clin Chem Lab Med* 2022 Aug;60:e250-e252. doi: 10.1515/cclm-2022-0503.