



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Neuroscienze

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI

INDIRIZZO: NEUROSCIENZE

CICLO: XXI

Tesi di Dottorato

PNS-EURONETWORK DATABASE:

Encefaliti limbiche paraneoplastiche

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Supervisore: Ch.mo Prof. Bruno Tavolato

Dottorando: Vitaliani Roberta

SOMMARIO

| | |
|---|------------|
| SOMMARIO | 2 |
| ABSTRACT | 5 |
| INTRODUZIONE | 8 |
| ENCEFALITI PARANEOPLASTICHE | 8 |
| ANTICORPI ANTI-NEURONE | 26 |
| ANTICORPI ANTI-NEURONE DIRETTI CONTRO ANTIGENI INTRACELLULARI..... | 27 |
| ANTICORPI DIRETTI CONTRO ANTIGENI DI SUPERFICIE..... | 40 |
| SCOPO DELLO STUDIO | 43 |
| MATERIALI E METODI | 44 |
| PAZIENTI | 44 |
| ANALISI DELLE REATTIVITÀ ANTICORPALI | 44 |
| ANALISI STATISTICA | 48 |
| RISULTATI | 49 |
| ENCEFALITE LIMBICA PARANEOPLASTICA | 49 |
| CARATTERISTICHE DELL'ELP PLUS <i>versus</i> ELP PURA | 59 |
| ENCEFALITE LIMBICA PLUS VERSUS ENCEFALOMIELITE | 70 |
| CARATTERISTICHE DELL'ELP PER TIPO D'ANTICORPO | 75 |
| ELP ASSOCIATA AD UNA REATTIVITÀ ANTICORPALE ATIPICA: CARATTERIZZAZIONE DI UN NUOVO ANTICORPO | 90 |
| DISCUSSIONE | 96 |
| ENCEFALITE LIMBICA PARANEOPLASTICA | 97 |
| CONFRONTO ENCEFALITE LIMBICA "PURA" VERSUS ENCEFALITE LIMBICA "PLUS" | 108 |
| ENCEFALITE LIMBICA ED ANTICORPI ANTI-NEURONE | 113 |
| IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA REATTIVITÀ ANTICORPALE | 127 |
| CONCLUSIONI | 129 |
| BIBLIOGRAFIA | 133 |

SOMMARIO

Background: L'encefalite limbica paraneoplastica (ELP) è stata identificata per la prima volta come entità clinica distinta da Corsellis et al., nel 1965 e si caratterizza sotto il profilo clinico per la presenza di deficit della memoria a breve termine, confusione, sintomi psichiatrici e crisi epilettiche. A oggi lo stato dell'arte relativo a tale patologia deriva principalmente dalla descrizione di due serie con un numero limitato di pazienti (Gultekin et al., nel 2000 e Lawn et al., nel 2003). Più recentemente le conoscenze sull'ELP si sono ampliate grazie all'identificazione di nuove reattività anticorpali e al riconoscimento di diversi quadri di presentazione clinica.

Scopo: Questo studio Europeo multicentrico è stato disegnato per analizzare le caratteristiche cliniche, oncologiche e immunologiche di un ampio gruppo di pazienti affetti da ELP e per identificare eventuali nuove reattività anticorpali dirette contro importanti antigeni neuronali.

Metodi: *Pazienti.* Nel 2002 è stato costituito un Network Europeo per le sindromi neurologiche paraneoplastiche (PNS-Euronetwork) supportato dalla Commissione Europea (QLGT-CT-2002-01756; LSSM-CT-2005 518174). È stato in seguito, costruito un database (PNS-database) in cui tutti i centri partecipanti dovevano inserire i pazienti con sindrome neureurologica paraneoplastica (SNP) diagnosticata dopo il 2000. Nel nostro studio, sono stati inclusi tutti i pazienti in cui fosse presente una diagnosi di ELP inclusi nel database fino al settembre 2008.

Analisi delle reattività anticorpali. I sieri dei pazienti sono stati analizzati mediante immunoistochimica su sezioni di encefalo di ratto, western blot su estratti proteici neuronali e immunoblot con proteina ricombinate. La presenza di anticorpi anti-canali per il potassio voltaggio dipendenti (VGKC) o per canali per il calcio voltaggio dipendenti (VGCC) è stata confermata mediante radioimmunoprecipitazione. Reattività anticorpali atipiche sono inoltre state studiate su colture di cellule ippocampali. In casi particolari è stata inoltre utilizzata immunocitochimica su cellule HEK-293 transfettate.

Analisi statistica. Termini proporzionali sono stati usati come statistica descrittiva per variabili categoriche e media e mediana per variabili continue. Per confrontare variabili qualitative sono stati utilizzati Test Chi quadro o test di Fisher. Mentre per variabili quantitative è stato utilizzato il test T-Student. Analisi sulla sopravvivenza sono state ottenute

attraverso il metodo di Kaplan Mayer e le differenze confrontate attraverso il Log-rank test. Le analisi sono state eseguite mediante SAS (versione 9.02, SAS system, Cary NC)

Risultati: Nel PNS database sono stati inclusi 917 pazienti di cui 104 risultarono affetti da PLE. I pazienti erano 66 maschi e 38 femmine di età media pari a 59.5 anni. La sindrome clinica si caratterizzava per la presenza di: deficit della memoria a breve termine (77%), stato confusionale (54.8%), crisi epilettiche (44.2%) -soprattutto di tipo parziale complesso (37%) o focale motorio (32.6%)- e sintomi psichiatrici (52.8%) -principalmente alterazione della personalità (54.5%) e depressione (32.6%). In 49 pazienti sono stati definiti come affetti da ELP “plus” in quanto presentavano sintomi indicativi del coinvolgimento di aree extralimbiche quali per esempio: atassia (n=15), neuropatia (n=11), encefalite del tronco (n=9), disautonomia (n=8). Un tumore è stato riconosciuto nel 90.4% dei pazienti ed i più frequenti sono stati lo SCLC (39.4%) ed il tumore testicolare (9.6%). Tra gli altri tumori, degno di nota è stato il riconoscimento in due casi dell’associazione con un tumore gastrico. Anticorpi anti-neurone sono stati riconosciuti nel 87.5% dei pazienti quelli più frequentemente riscontrati erano gli anti-Hu (56%) ed anti Ma2 (24.2%). I pazienti con anticorpi anti-Hu avevano più spesso uno SCLC ($p < 0.0001$) ed avevano una SNP che rispondeva meno al trattamento del tumore ($p = 0.044$) dei pazienti con anticorpi anti-Ma2 o senza anticorpi. Mentre raramente sono state riconosciute altre reattività anticorpali come anti-VGKC (n=2), anti-NMDAR (recettore N-Metil-D-aspartato) (n=2) and anti-Tr (n=1). Inoltre in un caso è stata riconosciuta una nuova reattività anticorpale diretta contro la sub unità gluR2 del recettore per il glutammato di tipo AMPA (a-ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionico acido). Solo il 12.5% dei casi non aveva anticorpi anti-neurone a confronto del 40% riportato in letteratura. All’esame del liquor si sono riconosciuti segni d’inflammation (aumento delle cellule e/o delle proteine e/o presenza di bande oligoclonali) in 58 su 83 esami disponibili. Non si sono inoltre riscontrate differenze significative quando sono stati confrontati gli esami liquorali eseguiti a più o meno di 3 mesi dall’esordio clinico. La RNM encefalica è risultata normale nel 26% dei casi. Nell’11% dei pazienti in cui la RNM era negativa è invece stata dimostrata la presenza di una positività alla FDG-PET encefalica. 46/104 pazienti sono stati trattati con farmaci immunomodulatori (soprattutto steroidi) e 16 hanno mostrato un miglioramento di almeno un punto alla scala di Rankin modificata. Mentre con il trattamento del tumore si è ottenuto un miglioramento della sindrome neurologica in 23 su 76 pazienti in cui la diagnosi di neoplasia era successiva all’esordio della sindrome

neurologica. Dal confronto delle caratteristiche cliniche, oncologiche ed immunologiche dei pazienti con ELP pura e plus non sono emerse differenze statisticamente significative se non per una maggiore frequenza del tumore testicolare nel primo gruppo. Nel gruppo con ELP plus inoltre, abbiamo identificato 21 soggetti che potevano essere riclassificati come affetti da encefalomielite paraneoplastica (EMP). Questi pazienti sono stati confrontati con i rimanenti 28 affetti da ELP plus. Da quest'analisi è emerso che i pazienti con EMP erano più anziani ($p=0.0221$) ed avevano più comunemente SCLC ($p=0.0111$), anticorpi anti-Hu ($p=0.0024$), RNM patologica ($p=0.0272$) e mortalità dovuta alla SNP ($p=0.0160$).

Conclusioni: La nostra è la più ampia casistica mai riportata in letteratura. I pazienti con ELP erano prevalentemente maschi ed avevano associate varie tipologie di tumore tra cui quella con tumore gastrico non precedentemente segnalata. Abbiamo inoltre osservato che una minor percentuale di pazienti, rispetto a quanto riportato in letteratura, non avevano anticorpi anti-neurone ed abbiamo anche identificato un nuovo anticorpo (anti-AMPAR) che allarga lo spettro delle ELP associate ad anticorpi diretti contro antigeni di superficie. Non abbiamo trovato differenze significative tra i casi con ELP pura e quelli con ELP plus tranne che per la maggior frequenza di tumore testicolare nel primo gruppo. Infine abbiamo osservato che la popolazione con ELP “plus” differiva da quella con EMP per età, maggiore associazione con SCLC, anticorpi anti-Hu e mortalità per patologia neurologica.

ABSTRACT

Background: Paraneoplastic limbic encephalitis (PLE) has been identified as a separated clinical entity by Corsellis et al. in 1965. It is clinically characterized by short term memory loss, psychiatric symptoms, confusion and seizures. To date there are only two case series with a limited number of patients describing PLE (Gultekin et al., 2000 and Lawn et al 2003).

Aims: This European multicenter study was designed to investigate the clinical, oncological and immunological profiles in a larger PLE population and to search for new antibodies targeted towards relevant neuronal antigens.

Methods: Patients. In 2002 a European network for Paraneoplastic neurological syndromes was developed (PNS-Euronetwork) thanks to the support of the European commission (QLGT-CT-2002-01756; LSSM-CT-2005 518174), which allowed the creation of a PNS database. The members of the network were invited to include in that database patients with PNS diagnosed after the year 2000. In this particular study we analyzed all PLE patients included in the database up till September 2008.

Antibodies detection. The patients' sera were analyzed by immunohistochemistry on rat brain sections and western blot on brain protein homogenate or immunoblot with recombinant proteins. The presence of voltage gated potassium channel (VGKC) antibodies or voltage gated calcium channel (VGCC) antibodies was confirmed by radioimmunoprecipitation assay. Atypical reactivities were studied on hippocampal cells cultures and in particular cases immunocytochemistry on transfected HEK-293 cells was employed.

Statistical analysis. Proportional terms were used as descriptive statistics for categorical variables and median and mean for continue ones. A t-Student test was used to compare quantitative variables, whereas a Chi-square test or a Fisher exact test for qualitative ones. Survival curves were obtained using the Kaplan-Mayer method and the differences compared with the Log-rank test. The analysis were performed using SAS (version 9.02, SAS system, Cary NC)

Results: In the PNS-database 917 patients were included and 104 of these were affected by PLE. The latter group was made up of 66 males and 38 females, and their median age was 61.5 years. The clinical picture was characterized by short term memory loss (77%),

confusional state (54.8%), seizures (44.2%) - mainly partial seizures (complex 37%, simple 32.6%)- and psychiatric disorders (52.8%) - mostly abnormal behavior (54.5%) and depression (32.7%). In 49 of our patients other symptoms were also detected: ataxia (n=15), neuropathy (n=11), brainstem encephalitis (n=9) and dysautonomia (n=8). These patients were referred as having PLE “plus”. A tumor was identified in 90.4% of patients: the more frequent ones were small cell lung cancer (SCLC) (39.4%) and testicular cancer (9.6%); worthy of note was the detection in two cases of a gastric cancer, which has never been reported in association with PLE. Anti-neuronal antibodies were present in 87.5% of patients and the most frequent ones were anti-Hu (56%) and anti-Ma2 (24.2%). Anti-Hu patients had more often SCLC ($p < 0.0001$) and a worse response to tumor treatment ($p = 0.044$) than patients with anti-Ma2 or patients without antibodies. On the other hand, other reactivities such as anti-VGKC (n=2), anti-N-metil-D-aspartate receptor (anti-NMDAR) (n=2) and anti-Tr (n=1) were rarely identified. Moreover in one patient we detected a new antibody directed against the gluR2 sub-unit of the AMPA (α-ammino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) glutamate receptor. Only 12.5% of patients with PLE did not have anti-neuronal antibodies, compared to 40% of cases reported in literature.

The CSF showed inflammatory signs (increased cells and/or proteins content and/or positive presence of oligoclonal bands) in 58 out of 83 available exams. There was no difference among CSF results regardless of the timing of lumbar puncture (before or after 3 months from the clinical onset). The brain MRI was unremarkable in 26% of cases, but 11% of these had a positive FDG-PET brain scan. Forty-six patients received and immunomodulatory treatment (mainly steroids) and 16 improved by at least 1 point on the modified Rankin Scale. Instead, by treating the tumor, a significant improvement of the neurological syndrome was obtained in 23 out of 76 patients in whom the tumor was detected after the neurological onset. The different clinical, oncological and immunological characteristics of the patients with PLE “plus” and PLE “pure” were compared. We did not find significant differences between these two groups with the exception of the prevalence of testicular cancer in the “pure” PLE cohort. In the PLE “plus” group, 21 patients could be classified as having paraneoplastic encephalomyelitis (PEM). This subgroup was then compared with the PLE “plus” cohort (28 patients): PEM patients were older ($p = 0,0221$), and were more frequently associated with SCLC ($p = 0.0111$), anti-Hu antibodies ($p = 0.0024$), pathological MRI ($p = 0.0272$) and mortality for PNS ($p = 0.0160$).

Conclusion: To our knowledge, this represents the largest series on PLE patients ever reported. We found that PLE is more frequent in males and it could be associated with different tumours including gastric cancer: this association has never been reported before. Moreover we observed a lower percentage of patients without antibodies compared to the literature and detected a new antibody (anti-AMPAR) which widens the spectrum of PLE associated with anti-neuronal surface antigens. We also found no significance difference between PLE “pure” and PLE “plus”, except for a higher prevalence of testicular cancer in the former group. Finally, the PLE “plus” cohort differs from the PEM group for age, association with SCLC, anti-Hu antibodies and mortality due to PNS.

INTRODUZIONE

ENCEFALITI PARANEOPLASTICHE

Le sindromi neurologiche paraneoplastiche (SNP) rappresentano un gruppo di malattie patogenicamente legate alla presenza di una neoplasia, non attribuibili all'invasione diretta del sistema nervoso (SN) da parte del tumore o ad altre cause di danno indiretto, quali fattori metabolici- nutrizionali, infettivi, coagulativi o tossici [1]. Queste sindromi sembrano invece essere determinate dallo sviluppo di una reazione immune diretta contro il tumore, che esprime antigeni condivisi dal sistema nervoso (SN), definiti onconeurali, causando, per "reazione crociata", danno anche a carico delle strutture nervose [2]. Il danno neurologico può colpire qualsiasi parte del sistema nervoso sia centrale (SNC) che periferico (SNP) e può essere selettivo, con coinvolgimento di una singola struttura cellulare, come per esempio la degenerazione delle cellule di Purkinje nei pazienti affetti da Degenerazione Cerebellare Paraneoplastica (DCP), oppure diffuso, con interessamento di aree multiple del sistema nervoso, come per esempio nell'Encefalomielite Paraneoplastica (EMP).

In questo studio ci focalizzeremo sulle forme che prevedono un coinvolgimento delle strutture encefaliche che sono: l'Encefalomielite (EMP) e l'Encefalite limbica (ELP).

ENCEFALOMIELITE

CENNI STORICI

Il termine "Encefalomielite con carcinoma" è stato introdotto per la prima volta da Henson et al., nel 1965 [3]. Tuttavia casi simili erano stati in precedenza descritti da Greenfeld, nel 1934, che però li aveva riportati sotto la dizione di "Degenerazione cerebellare subacuta". Egli, infatti, aveva descritto la presenza di noduli e infiltrati infiammatori perivascolari a livello del mesencefalo e del midollo spinale, in due pazienti con una degenerazione spino cerebellare subacuta associata in un caso a tumore della mammella e nell'altro a carcinoma bronchiale [4]. Inoltre, Henson et al., nel 1954 segnarono due pazienti con carcinoma ed evidenza clinica di danno a carico del tronco encefalico e del midollo in cui l'esame autoptico aveva evidenziato la presenza di una poliomielite cronica. Essi osservarono che la dizione "degenerazione cerebellare subacuta" era poco appropriata per descrivere questa combinazione di alterazioni neuropatologiche [5]. Tuttavia si dovette aspettare il 1965 perché

il termine Encefalomielite fosse coniato per descrivere pazienti con neoplasia, evidenza clinica d'interessamento di parti diverse del sistema nervoso e presenza, all'esame autoptico, di segni infiammatori in corrispondenza dell'encefalo, tronco encefalico, midollo spinale e dei gangli dorsali delle radici spinali [3]. Nel 1982 Henson e Urich riesaminarono 69 pazienti con EMP e identificarono che il 75% dei pazienti, il coinvolgimento del SNC era associato alla presenza di una neuropatia sensitiva e che il tumore più frequentemente associato (59% dei casi) era il tumore a piccole cellule del polmone (small cell lung cancer, SCLC) [6].

CARATTERISTICHE CLINICHE

Il termine EMP è, ora, utilizzato per definire una condizione caratterizzata, sul piano anatomopatologico dalla presenza di perdita neuronale, proliferazione microgliare e infiltrati infiammatori con distribuzione multifocale del sistema nervoso, cui corrisponde un quadro clinico d'interessamento polidistrettuale. La malattia può inizialmente presentarsi con segni e sintomi indicativi del coinvolgimento di una sola area del SN che in genere corrisponde a quella maggiormente coinvolta dal processo degenerativo-infiammatorio. In alcuni pazienti il quadro clinico può rimanere monosintomatico per tutto il decorso della malattia, ma nel 75%, anche di questi casi, l'esame autoptico rivela coinvolgimento multifocale del SN. Le aree colpite possono comprendere: i lobi temporali e il sistema limbico (encefalite limbica), il tronco encefalico (encefalite del tronco), il cervelletto (degenerazione cerebellare subacuta), il midollo (mielite), i gangli dorsali delle radici spinali (neuropatia sensitiva) e il sistema autonomo (disautonomia). Di seguito, saranno brevemente descritte le caratteristiche cliniche delle varie manifestazioni associate all'EMP.

Encefalite del tronco paraneoplastica

L'Encefalite del tronco paraneoplastica (ETP) si riscontra in un terzo dei pazienti con EMP, di cui può costituire il sintomo d'esordio nel 10% dei casi. Il quadro clinico riflette l'interessamento preferenziale del midollo allungato da parte del processo infiammatorio. Si caratterizza, pertanto, per la presenza di disartia (XII nervo cranico), disfagia e disfonia (X, IX nervi cranici), vertigine, atassia e nistagmo (interessamento del sistema olivare e delle proiezioni cerebellari) e sordità (VIII nervo cranico e vie acustiche) cui possono essere associati segni di coinvolgimento delle vie lunghe. Lo sviluppo di una paralisi bulbare progressiva è possibile sebbene raro. Più raramente è colpita la porzione mesencefalica e pontina che può determinare lo sviluppo di segni oculari quali: paralisi coniugata dello sguardo, oftalmoplegia internucleare, paralisi di singoli muscoli extraoculari, oscillopsia e

ospocloni. Inoltre raramente e tardivamente possono manifestarsi ipoventilazione centrale, e disordini del movimento acinetico rigidi (interessamento della sostanza nera mesencefalica) o discinetici, come corea e distonia (interessamento del subtalamo).

Degenerazione cerebellare paraneoplastica

La Degenerazione cerebellare paraneoplastica (DCP) è il sintomo di presentazione dell'EMP nel 10% dei casi, mentre segni di coinvolgimento cerebellare si evidenziano nel 20-25% dei casi durante il decorso della malattia. Di preferenza il quadro clinico si caratterizza per lo sviluppo di atassia del tronco, che prevale su quella degli arti, cui possono associarsi disartria e nistagmo. A livello anatomopatologico si riscontrano perdita delle cellule di Purkinje e un infiltrato infiammatorio diffuso, quest'ultimo raramente presente nelle forme di DCP isolata.

Encefalite limbica paraneoplastica

L'Encefalite limbica paraneoplastica (ELP) rappresenta il sintomo d'esordio dell'EMP nel 20% dei casi circa, mentre raramente, pazienti con EMP, esordita diversamente, sviluppano tale condizione. Le caratteristiche cliniche di questa sindrome saranno descritte in un paragrafo dedicato.

Mielite paraneoplastica

La Mielite paraneoplastica può essere segno di esordio della malattia nel 15%, mentre in circa la metà dei pazienti si hanno queste manifestazioni in un qualche momento durante il decorso della malattia. Si caratterizza, dal punto di vista anatomopatologico, dal prevalente interessamento dei corni anteriori del midollo spinale in modo bilaterale. L'infiltrato infiammatorio è generalmente intenso e la perdita neuronale può essere severa. Le lesioni possono essere limitate ad alcuni segmenti, generalmente il cervicale e il lombare, oppure estendersi lungo il midollo. La perdita dei motoneuroni causa degenerazione delle radici anteriori e delle parti motorie dei nervi periferici con successiva denervazione e atrofia muscolare. Si possono, inoltre, osservare anche degenerazione del tratto corticospinale, che sembra legata alle alterazioni della sostanza bianca dei tratti e non del primo neurone di moto in quanto, quasi mai si osservano alterazioni a carico della corteccia frontale motoria e premotoria. Talora si notano anche alterazioni a carico del nucleo di Clarke e delle vie spinocerebellari ascendenti. Clinicamente questa forma si presenta con deficit di forza e atrofia muscolare, con o senza fascicolazioni, che possono interessare sia gli arti inferiori sia quelli superiori anche in modo asimmetrico. È stato descritto, inoltre, il coinvolgimento della muscolatura facciale ed estensoria del collo .("testa cadente").

Disautonomia paraneoplastica

Il sistema nervoso autonomo può essere coinvolto nel 50% dei pazienti con EMP. Il quadro clinico è caratterizzato da: ipotensione ortostatica, impotenza, alterazione della sudorazione, stipsi e vescica neurologica. Nell'ambito dell'interessamento autonomo lo sviluppo di **Pseudoostruzione intestinale cronica** rappresenta una sindrome clinica ben caratterizzata e composta di: perdita di peso, stipsi ostinata e distensione addominale che in alcuni pazienti si associano a dismotilità esofagea e paralisi gastrica. Questa condizione è legata alla perdita di neuroni nel plesso mienterico ove si riscontra anche la presenza d'infiltrati infiammatori.

Neuropatia sensitiva subacuta paraneoplastica

La Neuropatia sensitiva subacuta paraneoplastica (NSSP) si riscontra nel 70% dei casi di EMP, di cui rappresenta il sintomo di esordio nel 60%. Le caratteristiche cliniche di tale patologia sono state descritte per la prima volta nel 1948 da Denny-Brown, per cui talora ci si riferisce a questa come alla sindrome di Denny-Brown [7]. Essa esordisce generalmente in maniera subacuta raggiungendo l'apice clinico in un periodo di pochi mesi dopo il quale si evidenziano solo modeste modificazioni, più raramente l'esordio è acuto o cronico. I sintomi e segni predominanti sono rappresentati da parestesie, disestesie dolorose, talora in attacchi, ipoestesia, che coinvolge tutte le modalità, riflessi tendinei ridotti od assenti, atassia sensitiva e pseudoatetosi. Sono coinvolti sia gli arti superiori sia gli inferiori, questi ultimi colpiti prevalentemente a livello distale e con distribuzione asimmetrica. Il tronco e la faccia possono talora essere coinvolti e in genere questo avviene più tardivamente e più raramente. Talora si può sviluppare sordità percettiva e paralisi degli sfinteri.

INDAGINI DIAGNOSTICHE

Gli studi di neuro-immagine cerebrale con Tomografia Assiale Computerizzata (TAC) o Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) sono generalmente normali tranne che nei casi in cui sia presente un quadro di ELP, dove si osserva la presenza di alterazioni nelle sequenze a TR lungo in corrispondenza dei lobi temporali mesiali, o nel caso vi sia una DCP in cui tardivamente nell'evoluzione della malattia atrofia del cervelletto. Nel sospetto di una NSSP lo studio elettrofisiologico è utile per l'identificazione di tale condizione mediante la dimostrazione di velocità di conduzione sensitiva marcatamente ridotta o assente con velocità di conduzione motoria conservata e assenza di segni di denervazione.

L'esame del liquor è normale nel 10% dei casi, mentre nei restanti, si può evidenziare una lieve pleiocitosi (prevalentemente mononucleata), un moderato incremento del contenuto proteico e/o la presenza di bande oligoclonali.

ANTICORPI ANTI-NEURONE

Nel siero e/o liquor di pazienti affetti da EMP si può riscontrare la presenza di una positività per anticorpi diretti contro antigeni onconeurali (questi saranno descritti dettagliatamente nella sezione successiva). Gli anticorpi più frequentemente associati sono gli anticorpi **anti-Hu**, ma si possono riscontrare anche anticorpi **anti-CV2/CRMP-5**, anticorpi **anti-amfifisina** e i meno ben caratterizzati anticorpi **anti-nucleo di tipo 3 (ANNA3)** ed **anti-cellule di Purkinje tipo 2 (PCA2)**. La presenza di un particolare tipo di anticorpo è dipendente dal tumore associato e ne condiziona il quadro clinico.

Encefalomielite associata ad anticorpi anti-Hu

Il termine anti-Hu fu utilizzato per la prima volta da Graus et al., per descrivere un anticorpo in grado di riconoscere all'immunoistochimica il nucleo nei neuroni di tutto il sistema nervoso [8]. In seguito divenne evidente che questi anticorpi erano riscontrati nella quasi totalità dei pazienti con encefalomielite associata a SCLC di cui divennero marcatori. L'encefalomielite associata ad anticorpi anti-Hu è pertanto anche definita come **'sindrome anti-Hu'**. Questa si caratterizza per colpire di preferenza soggetti fumatori di età media pari a 65 anni (con un intervallo di variabilità compreso tra i 20 e gli 80 anni). Le casistiche americane di Dalmau et al. [9] e Luchinetti et al. [10] suggeriscono una maggiore prevalenza della patologia nel sesso femminile (55-67%), mentre in una serie pubblicata da Graus et al. [11], su 200 pazienti di origine spagnola e francese, si dimostrava una predominanza nel sesso maschile (75%). Gli autori di quest'ultima serie attribuivano tale differenza alla diversa prevalenza, nei pazienti con SCLC, del sesso femminile tra le due popolazioni e sottolineavano come comunque le donne affette da SCLC avessero maggiore probabilità di sviluppare un quadro di EMP. Nella serie di 200 pazienti è inoltre riportato che il 30% dei pazienti sviluppa una sindrome neurologica confinata a un'area del SN (nel 2% dei casi si tratta di una ELP), mentre tutti gli altri pazienti hanno evidenza di un interessamento multifocale del SN. La NSSP era la sindrome più frequentemente riportata alla diagnosi (54% dei casi), mentre segni di un interessamento predominante del SNC sono stati riconosciuti nel 32.5% dei casi e le più comuni manifestazioni indicavano un coinvolgimento del cervelletto

(10.5%), del sistema limbico (9%) ed il tronco encefalico (6%). In tre casi il sintomo di presentazione è stato lo sviluppo di un quadro di epilessia parziale continua dovuto al coinvolgimento dell'area corticale sensitivo-motoria. Le caratteristiche cliniche riscontrate nella serie di pazienti descritta da Graus et al., e da Luchinetti et al., sono riportate in tabella n.1. Il tumore preferenzialmente associato ha localizzazione polmonare (85.6%) e, in misura largamente prevalente, è rappresentato dallo SCLC (80%). Raramente si riscontrano tumori con altra localizzazione quale: prostata, tratto gastrointestinale, mammella, vescica, pancreas, ovaio. Inoltre va ricordato che il riscontro di un tumore diverso dallo SCLC in pazienti con encefalomielite non esclude che tali pazienti presentino in realtà anche uno SCLC. Nella serie descritta da Luchinetti et al., si suggerisce pertanto che qualora un tumore diverso sia identificato in pazienti con encefalomielite e anticorpi anti-Hu la probabilità di riscontro di uno SCLC concomitante è elevata. In questa casistica è stata riconosciuta nel 13% dei pazienti una neoplasia non correlata oltre alla presenza di uno SCLC [10]. Per confermare l'associazione patogenetica tra tumore e sindrome neurologica si dovrebbe trovare una positività alla colorazione immunoistochimica con anticorpi anti-Hu sulle sezioni del tumore, mentre le neoplasie extratoraciche in pazienti senza encefalomielite quasi mai esprimono antigeni Hu [9].

Nella maggior parte dei casi (75%) la diagnosi della sindrome neurologica precede quella del tumore di circa sei mesi (con un intervallo di variabilità compreso fra 0.1 ed i 48 mesi). Nel 10% dei casi circa è invece il tumore a precedere la sindrome neurologica in media di 6 mesi (con una variabilità compresa tra 0.2 e 48 mesi); la comparsa di quest'ultima generalmente indica una progressione od una recidiva del tumore stesso. Resta comunque vero che in un 12% dei casi il tumore non è riscontrato nemmeno a livello autoptico. La sindrome neurologica si sviluppa generalmente in maniera subacuta (63%) e solo in una minoranza di casi l'esordio è acuto (20%) o cronico (17%). La maggior parte dei pazienti è severamente disabilitata al momento della diagnosi. A oggi la diagnosi e il trattamento precoce del tumore sembra essere l'unica strategia in grado di determinare almeno una stabilizzazione della sindrome neurologica [12]. È pertanto proposto che pazienti con EMP ad alto rischio di tumore polmonare (fumatori, di età > a 50 anni), vengano trattati con chemioterapia anche in assenza di un riscontro oggettivo di SCLC.

Tabella n.1. **Caratteristiche alla diagnosi di pazienti con EMP e anticorpi anti-Hu (ANNA-1) riportate in due serie di pazienti.**

| | Luchinetti et al. 1998 [10] | Graus et al. 2000[11] |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Numero di pazienti | 162 | 200 |
| Rapporto M:F | 1:2 | 3:1 |
| Età media (anni) | 64.5 | 63 |
| NSSP | 40% | 54% |
| DCP | 12% | 10.5% |
| ELP | 8% | 9% |
| ETP | NR | 6% |
| Mielite | 1.4% | NR |
| Disautonomia | 12% | 4% |

NSSP= neuropatia sensitiva subacutoparaneoplastica; DCP= degenerazione cerebellare paraneoplastica; ELP= encefalite limbica paraneoplastica; ETP= encefalite del tronco paraneoplastica; M= maschi; F= femmine; NR= non riportato.

Encefalomielite associata ad anticorpi anti-amfifisina

Gli anticorpi anti-amfifisina sono stati inizialmente riconosciuti in pazienti affetti da sindrome dell'uomo rigido (SMS= stiff men syndrome) associata alla presenza di tumore della mammella. Lo spettro delle patologie associate si è però allargato quando Dropcho, nel 1996, ha riportato la presenza di anticorpi anti-amfifisina in tre pazienti con EMP associata a SCLC [13]. Il primo caso era una donna di 54 anni con una sintomatologia clinica dominata da una NSSP ma con segni di coinvolgimento anche del tronco encefalico. Il secondo caso, una donna di 60 anni, si presentava con una debolezza muscolare diffusa associata ad un quadro clinico compatibile con quello di una NSSP mentre il terzo caso era un uomo di 67 anni che esordisce con confusione, rigidità, mioclono di entrambe le gambe e parestesie agli arti. In seguito altri casi sono stati descritti in cui tale anticorpo si associava a quadri di encefalomielite con caratteristiche cliniche non diverse dalle forme associate ad anticorpi anti-Hu [14,15,16]. In uno studio di 63 pazienti con anticorpi anti-amfifisina si è dimostrato che solo 1/3 dei pazienti aveva solo questo anticorpo. Il gruppo dei pazienti con soli anticorpi anti-amfifisina era costituito prevalentemente da donne con tumore della mammella e con un quadro clinico caratterizzato da rigidità, come nella sindrome dell'uomo rigido, o mielopatia con prevalente coinvolgimento motorio. Lo studio di neuro-immagine del midollo spinale in questi casi poteva essere normale oppure evidenziare la presenza di alterazioni di segnale

nelle sequenze pesate in T2 estese a più di 3 metameri con o senza acquisizione di mezzo di contrasto [17]. La presenza di una severa rigidità del tronco e degli arti e mioclono possono essere presenti nell'EMP associata ad anti-amfifisina, mentre questi sintomi non sono generalmente riscontrati nella forma associata ad anti-Hu.

Encefalite paraneoplastica associata ad anticorpi anti-CV2/CRMP5

Anticorpi anti-CV2 sono stati per la prima volta descritti in un paziente affetto da atassia, uveite e polineuropatia [18]. In seguito sono stati identificati anche in pazienti con altre manifestazioni neurologiche ed è stato riconosciuto che i tumori più frequentemente associati sono lo SCLC (59.6%) e il timoma (12.8%), mentre fra i tumori extratoracici lo sono il sarcoma uterino e il tumore della prostata. Recentemente inoltre è stata identificata una correlazione tra anti-CV2 e lo sviluppo di un'encefalite con interessamento preferenziale dei nuclei della base che si manifesta clinicamente con corea. In una recente pubblicazione Vernino et al. hanno riportato 16 casi di corea associata ad anticorpi anti-CV2. In 14 di questi pazienti la presenza di corea si associava ad encefalite limbica, perdita del visus, atassia e neuropatia sensitiva ed in 11 casi il tumore correlato era lo SCLC. In 5 dei pazienti esaminati è stata riscontrata alla risonanza magnetica cerebrale la presenza di aree perintense, nelle sequenze pesate in T2, in corrispondenza del caudato e della porzione anteriore del putamen. In due pazienti è inoltre stata eseguita una biopsia cerebrale che ha evidenziato la presenza di perdita neuronale, gliosi, e infiltrati linfocitari perivescolari a livello dei nuclei della base [19]. Nel 2001 Yu et al., riportarono le caratteristiche cliniche di 116 pazienti con anticorpi anti-CRMP5 (riconosciuto come l'antigene identificato dagli anticorpi anti-CV2). In questa serie di pazienti era rimarcata l'elevata frequenza di corea (11%) e di neuropatie dei nervi cranici (17%) soprattutto neuriti ottiche (7%), altre manifestazioni includevano neuropatie Periferiche (47%), disautonomia (31%), degenerazione cerebellare (26%), demenza subacuta (25%) e disordini della trasmissione neuromuscolare (12%). Il tumore associato anche in questo gruppo di pazienti era più frequentemente lo SCLC o il timoma [20]. Pazienti con anticorpi anti-CV2 possono quindi presentarsi con quadri di EMP le cui caratteristiche cliniche non sono dissimili dalla forma associata ad anticorpi anti-Hu. Nella forma associata ad anti-CV2, è tuttavia più frequente il riconoscimento di uveite, neurite ottica e corea che non sono tipicamente presenti nella forma associata ad anti-Hu. In un recente studio di confronto fra le sindromi paraneoplastiche associate ad anticorpi anti-Hu (n=324) e anti-CV2/CRMP5 (n=37) è stato dimostrato che in pazienti con questi ultimi anticorpi in

associazione a timoma si sviluppavano più frequentemente sindromi miasteniche. Inoltre quadri di corea e di sindrome miastenica sono stati riscontrati solo nei pazienti con anti-CV2/CRMP5 [21]

Encefalomielite associata ad anticorpi anti-PCA2

Nel 2004 Lennon et al., identificarono in 10 pazienti un nuovo anticorpo definito anti-PCA2 (vedi oltre) Una sindrome neurologica è stata riconosciuta in 9 su 10 pazienti e nella maggior parte dei casi si evidenziava un interessamento multifocale. I quadri clinici riconosciuti furono: LEP (n=3), ETP (n=2), sindrome miastenica di Lambert ed Eaton (LEMS) (n=2), DCP (n=3), malattia del motoneurone (n=1) [22]. Tuttavia questa è stata l'unica segnalazione riguardante questo tipo di anticorpo.

Encefalomielite associata ad anticorpi anti-ANNA3

Anticorpi anti-ANNA3 sono stati identificati da Chan et al., nel 2001, in una serie di undici pazienti 5 femmine e 6 maschi di età media pari a 59 anni (range 8-83 anni) [23]. Nove degli undici pazienti erano fumatori. Tre pazienti presentavano un quadro d'interessamento multifocale del sistema nervoso. Il primo caso era un uomo di 67 con un quadro clinico dominato dallo sviluppo di una DCP cui tardivamente si sono aggiunti sintomi di disfunzione autonoma e di ETP ed in cui è stata identificata la presenza di uno SCLC. Nel secondo caso si trattava di una donna di 66 anni con un quadro clinico caratterizzato dallo sviluppo di una neuropatia sensitiva motoria associata a ELP e sindrome da inappropriata secrezione di ADH (SIADH). In questa paziente è stata riconosciuta la presenza di una massa polmonare non ulteriormente caratterizzata. Nel terzo caso si trattava di una paziente di 83 anni in cui si è sviluppata una mielopatia e una DCP e in cui è stato riconosciuto un adenocarcinoma del polmone. Negli altri 8 casi il quadro clinico era caratterizzato da: neuropatia sensitivo-motoria (3 casi), DCP, atassia transitoria, mielopatia, ELP e crisi epilettiche. Una neoplasia è stata riconosciuta in 6/8 casi e in 4 casi era data da uno SCLC. Gli autori concludono che gli anticorpi ANNA3 non sono associati ad una particolare sindrome neurologica, ma sembrano essere un marcatore specifico per i tumori delle vie aeree associate al fumo.

ENCEFALITE LIMBICA PARANEOPLASTICA

CENNI STORICI

La prima descrizione di una reazione infiammatoria a livello degli emisferi cerebrali verificatesi in associazione alla presenza di una neoplasia è stata riportata da Brierley et al., nel 1960 [24]. Fino a quel momento vi era la convinzione che le sindromi neurologiche paraneoplastiche potessero interessare il sistema nervoso (SN) solo caudalmente ai nuclei della base. Brierley et al., descrissero tre pazienti di età adulta in cui si era sviluppata un'encefalite subacuta ad eziologia non nota e che interessava primariamente le aree limbiche del cervello. Uno dei tre casi descritti era quello di un uomo di 58 anni che era deceduto con un quadro clinico di demenza dopo tre mesi dall'esordio clinico al cui esame autoptico era stato riscontrato un linfonodo mediastinico ingrandito e invaso da cellule "a grano di miglio" come quelle riscontrate nel carcinoma bronchiale anaplastico. A livello encefalico in questo caso era stata riscontrata la presenza di un'intensa reazione infiammatoria indistinguibile da quella di un'encefalite che era particolarmente severa a livello della porzione mediale dei lobi temporali. Brierley et al., sottolinearono allora che, sebbene degna di nota, l'associazione tra l'encefalite limbica e la presenza di neoplasia era poco probabile. In seguito altri casi simili furono descritti. Nel 1961 Verhaart riportò la presenza di lesioni infiammatorie e Perdita cellulare neuronale a livello del lobo temporale mediale, nel tronco encefalico e nel cervelletto di due pazienti con linfonodi mediastinici contenenti cellule carcinomatose anaplastiche senza che una neoplasia primitiva fosse riscontrata [25]. Störning et al., descrissero nel 1962 il caso di un paziente di 49 anni che era diventato irrequieto e ansioso con allucinazioni e con successivo sviluppo di deficit della memoria a breve termine, ipersensibilità allo stimolo tattile e sudorazione eccessiva. Il paziente morì un anno dopo l'esordio clinico e all'esame autoptico fu riscontrata la presenza di un carcinoma bronchiale indifferenziato, mentre a livello encefalico fu evidenziata la presenza di una reazione infiammatoria assomigliante a un quadro di encefalite che era particolarmente marcata a livello del corno di Ammone, giro paraippocampale e fusiforme di entrambi i lati [26]. Yahar et al. nel 1965 pubblicarono un lavoro intitolato "Encephalopathy associated with carcinoma" in cui segnalavano il caso di una donna di 61 anni che aveva iniziato a presentare un deficit della memoria, disorientamento spaziale e temporale e una sindrome depressiva. In vita fu riscontrata la presenza di linfonodi mediastinici contenenti cellule di carcinoma anaplastico "a grano di miglio". La paziente morì tredici mesi dopo l'esordio clinico e a livello cerebrale fu identificata la presenza di perdita neuronale con infiltrazione linfocitaria solo a livello dei lobi

temporali [27]. Nel 1967 Ulrich et al., descrissero lo sviluppo di sclerosi ippocampale come effetto a distanza di un carcinoma bronchiale a piccole cellule in un uomo di 58 anni che si presentava con lo sviluppo rapidamente progressivo di deficit della memoria [28]. Furono tuttavia Corsellis et al., nel 1968, a descrivere altri tre casi e a coniare per primi il termine Encefalite limbica. Essi sottolinearono che vi erano ormai evidenze a supporto della presenza di un gruppo di pazienti con neoplasia che sviluppavano una severa reazione tissutale, descritta sia come infiammatoria che come degenerativa, a livello della sostanza grigia limbica di entrambi gli emisferi. Il tumore riscontrato in questi pazienti era generalmente di origine bronchiale, piccolo per dimensioni e costituito da cellule “a grano di miglio”. Il quadro clinico neurologico era definito dall’esordio subacuto di una sindrome clinica caratterizzata dalla presenza di disturbi dell’umore, generalmente ansia severa o depressione, deficit della memoria a breve termine con possibile evoluzione verso un quadro di franca demenza e talora allucinazioni o crisi epilettiche [29]. Da allora sono stati descritti numerosi altri casi che tracciarono le caratteristiche di questa sindrome.

CARATTERISTICHE CLINICHE

Il quadro clinico è definito dalla presenza di sintomi psichiatrici che comprendono ansia, depressione, agitazione e allucinazioni sia visive che uditive fino a quadri di franca psicosi. Spesso il quadro neurologico è dominato dalla presenza di un deficit della memoria a breve termine che può rimanere isolato oppure associarsi ad altri segni di disfunzione cognitiva fino a un quadro di franca demenza e/o associarsi agli altri sintomi dell’encefalite limbica. Frequenti sono inoltre le crisi epilettiche generalmente di tipo parziale complesso a origine temporale.

INDAGINI DIAGNOSTICHE

L’elettroencefalografia (EEG) generalmente rivela la presenza di foci di attività epilettica in uno o entrambi i lobi temporali oppure evidenzia un’attività lenta diffusa. Pur non essendo un esame diagnostico, è particolarmente utile in quanto, fornisce la possibilità di discriminare uno stato confusionale da una crisi epilettica parziale complessa a origine temporale. Lo studio di neuro immagine mediante TAC è generalmente normale, salvo che in alcuni casi può evidenziare la presenza di aree d’ipodensità a livello di uno o entrambi i lobi temporali. Nel 1988 Koeler et al., descrissero il primo caso d’incremento di segnale nelle sequenze pesate in T2 a livello dei lobi temporali mediali nelle fasi acute dell’Encefalite limbica [30].

Fu dimostrato inoltre che tali lesioni corrispondevano la presenza d'infiltrato infiammatorio all'autopsia e inoltre fu evidenziato che, in alcuni casi, tali lesioni potevano evolvere verso un quadro di sclerosi ippocampale [31,32]. Oggi è riconosciuto che, nella fase acuta di malattia, sono presenti alterazioni nelle sequenze a TR lungo nel 70-80% dei casi. La tomografia a emissione di positroni con florodesossiglucosio (FDG-PET), può rivelare la presenza di un ipermetabolismo prima che si riconoscano anomalie alla RNM encefalica e può modificarsi con l'andamento clinico della malattia, mentre le alterazioni in RNM rimangono generalmente invariate [33]. Alla FDG-PET, qualora le crisi epilettiche siano escluse, un ipermetabolismo indica la sede del processo infiammatorio o immunomediato [34].

L'esame del liquor è anormale in un 80% dei casi ed evidenzia una lieve pleiocitosi con incremento del contenuto proteico e/o presenza di bande oligoclonali.

Nel 60% dei casi la sindrome neurologica precede la diagnosi di neoplasia di mediamente 3.5 mesi (con intervallo di variabilità: 0.5-33 mesi). Le neoplasie più frequentemente associate comprendono: tumore del polmone (50%), dei testicoli (20%) e della mammella (8%). Altre neoplasie più raramente riscontrate comprendono: linfoma di Hodgkin (4%), timoma (2%), teratoma (4%), tumore della vescica, del colon e del rene [35]. Indagini diagnostiche volte alla ricerca della neoplasia associata quali TAC torace e addome o TAC-PET sono mandatorie nel sospetto di un'ELP.

ANTICORPI ANTI NEURONE

Nel liquor e/o nel siero, del 60% circa dei pazienti, possono essere riscontrati anticorpi anti-neurone. Studi recenti enfatizzano la necessità di classificare l'encefalite limbica in sottotipi in accordo con la localizzazione del principale antigene bersaglio: encefalite limbica con anticorpi diretti contro antigeni intracellulari ed encefalite limbica diretta con anticorpi diretti contro antigeni di superficie. La categorizzazione in questi sottogruppi sembra importante in quanto, anticorpi diretti contro antigeni di superficie hanno una maggiore probabilità di quelli diretti contro antigeni intracellulari di svolgere un ruolo patogenetico di primaria importanza nella genesi della malattia. È quindi più probabile che pazienti con questo tipo di anticorpi possano beneficiare di trattamenti rivolti alla rimozione degli stessi [36].

Encefalite limbica con anticorpi diretti contro antigeni intracellulari

Gli anticorpi diretti contro antigeni intracellulari sono riconosciuti nel siero e/o nel liquor dei pazienti e spesso sono identificabili anche a distanza di mesi o anni dopo il trattamento del tumore o l'immunoterapia. Gli studi autoptici e biotici indicano che questi siano un marcatore di malattia, mentre il meccanismo patogenetico implicato nella genesi della sindrome neurologica è verosimilmente mediato da linfociti T di tipo citotossico. I principali antigeni intracellulari associati all'ELP sono Hu, Ma2 e meno frequentemente CV2/CRMP5 le cui caratteristiche saranno descritte brevemente in seguito. Altri anti anticorpi diretti contro antigeni intracellulari che sono stati associati raramente all'ELP comprendono: gli anticorpi anti-amfifisina in pazienti con SCLC [37] e gli anti-Ri di cui sono stati riportati due casi associati rispettivamente a un tumore mediastinico e a un carcinoma del polmone [38,39]. Sono stati inoltre descritti alcuni casi di ELP associata ad anticorpi anti-decarbossilasi dell'acido glutammico (anti-GAD). L'encefalite limbica associata ad anticorpi anti-GAD può essere sia idiopatica che paraneoplastica ed in quest'ultimo caso correla in genere con timoma o con SCLC [40,41].

Più recentemente è stato descritto il caso di un paziente con una storia di confusione, alterazione della personalità e deficit della memoria a breve termine associata alla presenza di SCLC nel cui siero è stato identificato un anticorpo diretto contro BR serina/treonina chinasi 2 (BRSK2). La BRSK2 è una proteina implicata nella polarizzazione neuronale e nello sviluppo sinaptico [42].

Encefalite limbica associata ad anticorpi anti-Hu

Gli anticorpi anti-Hu correlano generalmente con un coinvolgimento multifocale del SN che si configura nel quadro precedentemente descritto di encefalomielite. In alcuni casi tuttavia possono associarsi a una manifestazione più focale come l'ELP. In circa il 70% dei pazienti con ELP e anti-Hu il tumore associato è lo SCLC mentre è stato riscontrato che solo il 50% dei pazienti con ELP e SCLC hanno anticorpi anti-Hu. La presenza di anticorpi anti-Hu sembra tuttavia costituire fattore prognostico negativo in quest'ultimo gruppo di pazienti. In alcuni casi il quadro clinico può presentarsi con sole crisi epilettiche ad origine temporale e talora anche con un quadro di stato di male epilettico. Recentemente è stato riportato il caso di una donna con epilessia orgasmica quale quadro di presentazione di un'ELP associata ad anticorpi anti-Hu e SCLC [43].

Encefalite limbica con anticorpi anti-Ma

Nell'80% circa dei pazienti con ELP il tumore associato è lo SCLC e nel 50 % circa di questi si riscontra la presenza di anticorpi anti-Hu. Nel 20% dei pazienti con ELP e tumori altri dallo SCLC Voltz et al., hanno riconosciuto una frequenza superiore all'attesa di tumore testicolare. Questi autori hanno inoltre dimostrato che nel siero e/o liquor di 10 su 13 pazienti con sindrome neurologica e tumore testicolare era possibile riscontrare un anticorpo che essi definirono anti-Ma2[44]. In seguito Rosenfeld et al., dimostrarono che l'autoantigene Ma2 è il principale antigene di una famiglia di tre proteine Ma (Ma1, Ma2 e Ma3) con un ruolo nella biogenesi dell'mRNA, che sono espresse a livello testicolare, encefalico e del tumore associato alla SNP in pazienti con anticorpi anti-Ma. Gli stessi autori hanno inoltre sottolineato che la presenza di anticorpi anti-Ma2 in pazienti con SNP correla con una più probabile risposta al trattamento di altre SNP con interessamento centrale [45].

Gli anticorpi anti-Ma sono riscontrati più frequentemente in soggetti maschi di giovane età con tumore testicolare. In soggetti di sesso femminile e in pazienti maschi di età superiore a 50 anni i tumori più comunemente riscontrati sono lo SCLC ed il tumore della mammella. Una classica ELP è riconosciuta nel 20% dei casi, ma la maggior parte dei pazienti, 95% in uno studio su 38 pazienti, sviluppa un'encefalite con coinvolgimento del sistema limbico, tronco encefalico e/o diencefalo. Sintomi di coinvolgimento del diencefalo comprendono: una'eccessiva sonnolenza diurna talora con narcolessia a cataplessia e con bassi valori d'ipocretina, disordini del sonno REM, allucinazioni ipnagogiche, crisi gelastiche, ipertermia, aumento di peso e diabete insipido. Mentre segni d'interessamento del tronco encefalico si manifestavano principalmente con e con paralisi dello sguardo verticale che può evolvere verso una oftalmoplegia completa. Altri sintomi meno frequenti comprendono parkinsonismo, ipocinesia e atassia cerebellare [46,47,48].

Un quadro di atassia cerebellare associato a segni di disfunzione del tronco encefalico è invece più comune in pazienti che hanno anticorpi anti-Ma1 e anti-Ma2. La maggior parte dei pazienti con anticorpi anti-Ma2 ha alterazioni alla RNM encefalica a livello del lobo temporale mesiale, talamo, ipotalamo e mesencefalo, ma a livello autoptico le alterazioni sono spesso più diffuse. L'esame del liquor è alterato nella maggior parte dei pazienti (78%) con aumento del contenuto cellulare (in prevalenza mononucleati), di quello proteico e/o presenza di bande oligoclonali [46]. L'encefalite associata ad anticorpi anti-Ma2 migliora in circa un terzo dei pazienti con l'immunoterapia (corticosteroidi e immunoglobuline per endovena) e il trattamento del tumore. Fattori prognostici favorevoli sono: età inferiore ai 50 anni, sesso

maschile, tumore testicolare che risponde al trattamento, malattia neurologica limitata in estensione. Nei soggetti di sesso maschile e di età inferiore ai 50 anni con encefalite associata ad anti-Ma2 viene pertanto raccomandata l'orchietomia qualora non vi siano evidenze di altro tumore e vi sia evidenza di nuovo ingrossamento testicolare, calcificazioni testicolari alla ecografia o storia di criptorchidismo per il frequente riscontro in questi soggetti di tumore germinale intratubulare microscopico [49].

Encefalite limbica associata ad anticorpi anti-CV2/CRMP5

Come affermato in precedenza, anticorpi anti-CV2 possono associarsi a una varietà di sintomi neurologici tra cui l'ELP che può manifestarsi in forma isolata. Nei pazienti con anti-CV2 è però più frequente l'associazione dell'encefalite limbica con disordini del movimento di tipo ipercinetico soprattutto coreiformi [50]. Il tumore associato tipicamente è lo SCLC o il timoma, ma si può riconoscere anche la presenza di tumore testicolare come recentemente riportato da Kellinhaus et al [51]. Inoltre Knudsen et al., nel 2007, descrissero il caso di un paziente di 52 anni che si era presentato all'osservazione clinica per lo sviluppo subacuto di un declino cognitivo, allucinazioni ed agitazione in cui è stata riscontrata la presenza di un timoma associato. Nel siero di questo paziente gli autori identificarono la presenza di anticorpi diretti contro proteine della famiglia delle collapsin response mediator protein tipo 3 e 4 (CRMP3 e CRMP4) [52]. Queste appartengono a una famiglia di quattro fosfoproteine (CRMP1-4) espresse nei neuroni in via di sviluppo e sono implicata nella via della trasduzione del segnale che porta alla crescita assonale. Il quinto membro della famiglia è la proteina CRMP5 ha un'omologia di sequenza del 50% con le altre proteine.

Encefalite limbica associata ad anticorpi diretti contro antigeni di superficie.

In questo gruppo sono comprese le forme di ELP che si associano ad anticorpi che più probabilmente svolgono un ruolo patogenetico nella genesi della sindrome neurologica e che Pertanto rispondono più frequentemente alle terapie volte alla rimozione degli anticorpi stessi. In questo gruppo sono incluse l'encefalite limbica associata ad anticorpi contro i canali per il potassio a voltaggio dipendenti (anti-VGKC) e gli anticorpi anti canali per il calcio a voltaggio dipendenti (anti-VGCC). È compresa per semplicità in questo gruppo anche l'encefalite associata ad anticorpi contro il recettore per il glutammato di tipo N-Metil-D-associato (anti-NMDAR) che non è propriamente un'encefalite limbica e le cui caratteristiche saranno riportate di seguito. Va sottolineato inoltre come stia emergendo la possibilità che pazienti

con ELP associata ad anticorpi intracellulari abbiano in realtà nel siero anche anticorpi diretti contro antigeni di superficie e che siano questi ultimi ad avere un ruolo patogenetico nella malattia [53].

Encefalite limbica associata ad anticorpi anti-VGKC

Anticorpi anti-VGKC sono stati riconosciuti essere responsabili dello sviluppo di Neuromiotonia (NMT), una patologia con interessamento del SNP clinicamente definita dalla presenza di rigidità, crampi muscolari, miocimie ed eccessiva sudorazione [54]. Recentemente è stato però evidenziato che tali anticorpi possono essere coinvolti anche nello sviluppo di sindromi che colpiscono il sistema nervoso centrale: corea fibrillare ed encefalite limbica. La corea fibrillare, più comunemente conosciuta come sindrome di Morvan, è stata descritta per la prima volta da Morvan, nel 1890, in cinque pazienti che presentavano multiple contrazioni irregolari a livello muscolare, crampi, debolezza, prurito, iperidrosi, insonnia e delirio [55]. La sindrome si caratterizza per la presenza di neuromiotonia associata a disordini autonomici, quali eccessiva sudorazione e lacrimazione, aritmia cardiaca, costipazione e incontinenza urinaria, e a sintomi d'interessamenti del SNC quali disturbi del sonno e del comportamento, allucinazioni, deficit cognitivo e mnesico. L'esame del liquor e la RNM encefalica sono spesso normali [56]. Più spesso si tratta di una malattia autoimmune non paraneoplastica tuttavia in alcuni casi è possibile riscontrare un'associazione con tumore che più spesso ha sede timica [57]. In alcuni casi di sindrome di Morvan, sia paraneoplastica sia non paraneoplastica, sono stati identificati anticorpi anti-VGKC [58, 59]. Anticorpi anti-VGKC sono stati inoltre riscontrati in pazienti con un quadro di "Encefalite limbica potenzialmente reversibile". Questa sindrome si caratterizza per un esordio clinico generalmente rappresentato da deficit mnesico, stato confusionale, disorientamento e da crisi epilettiche focali o generalizzate. Nello spettro delle manifestazioni cliniche talora possono essere presenti anche allucinazioni e alterazioni della personalità, con irritabilità e aggressività. In alcuni pazienti sono stati riconosciuti segni di disfunzione autonoma e neuromiotonia rendendo ragione della probabile esistenza di uno spettro continuo di manifestazioni, coinvolgenti il sistema nervoso sia periferico che centrale, correlate alla presenza di anticorpi anti-VGKC [60-62]. Agli esami ematochimici è frequente il riscontro iponatriemia; mentre l'esame liquorale rivela un incremento della concentrazione proteica, un assente o minimo aumento dei leucociti e talora la presenza di bande oligoclonali [63]. All'EEG si riscontrano spesso alterazioni non specifiche, mentre allo studio di RMN si

osservano aree d'iperintensità, nelle sequenze pesate in T2, a livello della porzione mediale dei lobi temporali uni o bilaterali [60]. L'encefalite limbica associata ad anticorpi anti-VGKC è più spesso una forma autoimmune non paraneoplastica tuttavia da una revisione dei dati di letteratura si evince che tra il 25 ed il 30% una neoplasia associata, più frequentemente un tumore del timo od uno SCLC [64-68]. La presenza di una neoplasia sottostante in particolare di uno SCLC può essere suggerita dalla concomitante presenza di anticorpi anti- nucleo gliare (AGNA) [69]. I pazienti con ELP associata ad anti-VGKC non differiscono sotto il profilo clinico dai pazienti con altre forme di ELP se non per un più frequente riscontro di un andamento clinico di tipo recidivante remittente e una più frequente risposta a trattamenti che interferiscono con la risposta immunitaria anticorpo-mediata (PA, IVIg, steroidi).

Encefalite limbica associata ad anti-VGCC

Gli anticorpi anti-VGCC sono più comunemente ritenuti associati alla LEMS che nel 60% dei casi può essere di origine paraneoplastica e associarsi a SCLC [70]. Tuttavia è stata riconosciuta la possibilità che questi trovino anche in pazienti con sindromi neurologiche centrali come la DCP [71]. Più recentemente sono stati descritti anche casi di encefalite limbica associata a questi anticorpi. In una serie di 24 pazienti con ELP Lawn et al riportarono che l'82% dei pazienti aveva anticorpi anti- neurone e che i più frequentemente riconosciuti erano gli anti-VGCC di tipo N e gli anti-CRMP5 [72]. Anticorpi anti-VGCC sono stati anche riconosciuti da Weimer et al., in un paziente di 45 anni con SCLC che è stato sottoposto a lobectomia temporale Per uno stato di male epilettico secondario ad un quadro di encefalite limbica [73].

Encefalite limbica associata ad anticorpi anti-NMDAR

Anticorpi anti-NMDAR sono stati identificati in giovani donne con associata presenza di teratoma dell'ovaio che si presentano con un quadro encefalitico potenzialmente trattabile [74-79]. La sindrome clinica esordisce spesso in modo acuto e preceduto da sintomi influenzali. Il quadro clinico è determinato da sintomi psichiatrici, spesso severi comprensivi di alterazioni della personalità, paranoia, delirio fino a un quadro di franca psicosi. Spesso la diagnosi iniziale è quella di una schizofrenia per cui in prima istanza i pazienti possono essere accolti in unità psichiatriche. Sono inoltre presenti deficit della memoria di tipo recente e crisi epilettiche con talora evoluzione verso uno stato di male epilettico. Oltre a questi sintomi indicativi di un coinvolgimento delle aree limbiche vi sono evidenze d'interessamento anche

di altre zone cerebrali quali il tronco encefalico e i nuclei della base. Infatti, sono presenti: ipoventilazione centrale, discinesie orali, mioclono, coreoatetosi, movimenti balistici, distonia. L'ipoventilazione centrale, lo sviluppo di uno stato di male epilettico e/o di una severa disautonomia, richiede spesso in trattamento di tipo intensivo e possono condurre rapidamente al decesso del paziente. A differenza dell'encefalite associata ad anticorpi anti-VGKC non si riscontra in genere iponatriemia. Una pleiocitosi linfocitaria o la presenza di bande oligoclonali sono presenti all'esame del liquor nella maggior parte di questi pazienti. La RNM encefalica è invece spesso normale, ma possono essere riconosciute alterazioni soprattutto nelle sequenze a TR lungo che non si limitano ai lobi temporali mesiali, ma che si estendono a coinvolgere la corteccia cerebrale, il cervelletto e il tronco encefalico. A livello anatomopatologico si trovano perdita neuronale e proliferazione microgliale soprattutto a livello ippocampale, mentre più rari sono infiltrati infiammatori e perivascolari di linfociti T. La maggior parte dei pazienti ha un teratoma dell'ovaio che nel 70% dei casi è benigno. In alcuni pazienti il teratoma è stato riconosciuto a livello mediastinico, ma sono segnalati anche casi in cui non è stato riscontrato alcun tipo di tumore. Va sottolineato che, l'identificazione della neoplasia richiede l'uso di TAC del torace e dell'addome e di un'ecografia intravaginale mentre, la PET può essere negativa se il tumore è benigno. La sindrome neurologica risponde in genere a un trattamento immunomodulatorio con plasmaferesi, immunoglobuline per via endovenosa (IVIg) e/o immunosoppressione, tuttavia la rimozione del tumore appare necessaria affinché il miglioramento rimanga stabile [77,80]. Va ricordato che sono descritti anche casi in cui non è stata riscontrata la presenza di una neoplasia associata e che la sindrome può essere riconosciuta anche in soggetti di sesso maschile [81].

ANTICORPI ANTI-NEURONE

Anticorpi anti-antigeni neuronali sono stati identificati nelle SNP per la prima volta nel 1965 da Wilkinson e Zeromski che dimostrarono la presenza nel siero di pazienti con SCLC e ganglionite dorsale paraneoplastica di un anticorpo diretto contro il nucleo dei neuroni, attualmente conosciuto come anti-Hu [82]. Da allora diversi anticorpi sono stati dimostrati in associazione a SNP. La dimostrazione che questi anticorpi sono diretti contro antigeni espressi dal sistema nervoso, sito immunologicamente privilegiato, ma non in altre parti dell'organismo, e che i medesimi antigeni possono essere espressi dalle cellule neoplastiche ha supportato l'ipotesi che le SNP potessero essere causate dallo sviluppo di una risposta immunitaria scatenata dalla presenza del tumore. Si suppone, infatti, che, qualora questi antigeni siano espressi dalle cellule neoplastiche, si possa scatenare una risposta immune principalmente rivolta al controllo della crescita del tumore. Quando tuttavia questa risposta è particolarmente intensa, si avrebbe come conseguenza un danno a carico delle porzioni del sistema nervoso che esprimono il medesimo antigene. In alcuni casi il ruolo patogenetico di questi anticorpi è certo come per esempio nel caso della LEMS in altri invece il loro ruolo rimane elusivo. Tuttavia, lo stesso antigene riconosciuto da questi, è talora il bersaglio di linfociti citotossici presenti in pazienti con SNP; questo suggerisce che gli anticorpi anti-neurone possano essere parte di una complessa risposta immunitaria che conduce allo sviluppo della malattia [2].

Gli anticorpi anti-neurone (anche noti come anticorpi contro antigeni onconeurali) possono essere schematicamente suddivisi in diretti contro antigeni intracellulari, principalmente citosolici-nucleari, e diretti contro antigeni di superficie e relazionati alle sinapsi. La categorizzazione in questi sottogruppi appare di notevole importanza in quanto, anticorpi diretti contro antigeni di superficie hanno una maggiore probabilità di quelli diretti contro antigeni intracellulari di svolgere un ruolo patogenetico di primaria importanza nella genesi della malattia. È quindi più probabile che pazienti con questo tipo di anticorpi possano beneficiare di trattamenti rivolti alla rimozione degli stessi.

ANTICORPI ANTI-NEURONE DIRETTI CONTRO ANTIGENI INTRACELLULARI

Anti-Hu

Nel 1985 Graus et al., dimostrarono la presenza, nel siero di due pazienti affetti da neuropatia sensitiva subacuta e SCLC, di un anticorpo che riconosceva il nucleo di tutti i neuroni del sistema nervoso sia centrale sia periferico. Tale anticorpo fu chiamato anti-Hu dalle iniziali del paziente descritto e probabilmente corrispondeva a quello riconosciuto in precedenza da Wilkinson e Zeromski in 4 pazienti con neuropatia sensitiva associata a tumore [8, 82]. In seguito è stato riconosciuto che questi anticorpi si riscontrano nel 90% dei pazienti con EMP e che il tumore più frequentemente associato è lo SCLC (più del 70% dei casi) seguito tra i tumori extratoracici da tumore della prostata, gastrointestinale, mammella, vescica, pancreas ed ovaio. È importante notare che anticorpi anti-Hu possono essere riscontrati nel 2% di pazienti senza tumore a un follow up maggiore di 5 anni [11]. Inoltre il 16% circa dei pazienti con SCLC, in assenza di sindrome neurologica, possono presentare una reattività a basso titolo per anticorpi anti-Hu [83].

Si tratta di un'immunoglobulina di tipo G (IgG) policlonale legante il complemento. È riconosciuto con metodica immunoistochimica in quanto, determina una forte colorazione del nucleo dei neuroni del sistema nervoso centrale e periferico con risparmio del nucleolo, mentre si evidenzia una debole colorazione a livello del citoplasma (figura n.1). Sulla base della caratteristica istochimica tale anticorpo è anche conosciuto come ANNA-1 (anti neuronal nuclear antibody type 1). Mediante Western Blot (WB), usando sia lisato di cellule neuronali umane che di ratto, si evidenzia una tripla banda nella regione corrispondente al peso molecolare di 35-40 kD (figura n7). L'identificazione degli antigeni associati all'anti-Hu ha consentito inoltre la produzione di una proteina ricombinante di 43 kD (corrispondente all'antigene HuD) che viene attualmente utilizzata per aumentare la sensibilità e specificità di ricerca degli anticorpi anti-Hu.

Antigeni-Hu

Lo screening di una libreria di espressione di cDNA con anticorpi anti-Hu ha portato all'identificazione di due geni altamente omologhi denominati HuD e HuC che fanno parte di una famiglia di geni codificante per proteine leganti RNA altamente conservata [84]. Il membro fondatore di tale famiglia è il gene ELAV (embryonic lethal abnormal vision protein) di drosofila che è noto, essere necessario per lo sviluppo ed il mantenimento del sistema

nervoso del moscerino. In virtù delle sue analogie con ELAV è stato identificato un altro gene umano *Hel-N1*. Questi geni codificano per proteine, chiamate proteine Hu, che contengono tre motivi di riconoscimento del RNA (RRMs-RNA recognition motif). Le proteine HuD, HuC e *Hel-N1* sono espresse principalmente dal sistema nervoso e sono riconosciute costantemente dagli anticorpi anti-Hu. Esiste una quarta proteina Hu, chiamata HuR, la cui espressione non è ristretta ai neuroni e che è inconsistentemente riconosciuta dagli anticorpi anti-Hu. Le proteine Hu sono inoltre espresse dallo SCLC e dalla maggior parte dei neuroblastomi. L'esatto ruolo degli antigeni bersaglio dagli anticorpi anti-Hu non è completamente noto tuttavia si suppone che questi siano implicati nella differenziazione e nel mantenimento del fenotipo neuronale probabilmente mediato da un'azione di regolazione del turnover degli mRNA. Studi su HuD hanno dimostrato che questo si lega con alta affinità agli elementi ricchi in AU (AREs) degli mRNA di geni che regolano la proliferazione neuronale (*c-myc*, *c-fos* e *gm-CSF*). Il legame di HuD e proteine elav simili agli ARE implica un ruolo nella regolazione del turnover degli RNA [85]. Poiché, HuD non mostra attività endonucleasica è ipotizzabile che dopo il legame ad ARE, possa reclutare la formazione di un complesso di maggiori dimensioni e che questo abbia la funzione di degradare gli RNA. Questi riscontri, insieme all'identificazione della precoce espressione degli antigeni Hu nella neurogenesi dei vertebrati, forniscono un modello interpretativo sul ruolo di HuD nello sviluppo neuronale e nell'oncogenesi: L'espressione di HuD è legata alla trasformazione dei neuroblasti in neuroni. A questo stadio della differenziazione, molti RNA legati alla proliferazione sono inattivati e questo processo può essere mediato dall'espressione degli antigeni Hu. Inoltre la mutazione di proteine simili a elav, nei tumori può causare una perdita della loro funzione soppressiva e alla conseguente espressione dei geni *c-myc* e *c-fos* che conduce alla ripresa del ciclo cellulare [86,87]. È interessante osservare che le sequenze necessarie per il legame agli AREs sono confinate al primo e secondo RRM, che corrispondono alle regioni più immunogene e quindi agli anticorpi anti-Hu reagiscono con regioni funzionalmente importanti [88].

Anti-Yo

Nel 1983 Greenlee e Brashear, descrissero un anticorpo diretto contro il citoplasma delle cellule di Purkinje in due pazienti con degenerazione cerebellare e tumore dell'ovaio [89]. Due anni dopo Jaekle et al., confermarono tale riscontro e chiamarono l'anticorpo anti-Yo dalle iniziali della prima paziente descritta [90]. Anticorpi anti-Yo sono riconosciuti nel 60%

circa di pazienti con DCP. Si tratta in genere di donne con tumori ginecologici: ovaio, utero e mammella. Sono stati però descritti casi con vari adenocarcinomi, carcinoma a cellule transizionali della vescica o linfoma. È importante inoltre ricordare che anticorpi anti-Yo si possono riscontrare nel 2% di pazienti con DCP in assenza di tumore a un follow up superiore ai 5 anni e nel 2% di pazienti con tumore della mammella o ginecologici in assenza di sindrome neurologica paraneoplastica a titoli paragonabili a quelli riscontrati nei pazienti con SNP [91]. Si tratta di IgG policlonali, appartenente in misura predominante alla sottoclasse IgG1, che sono riconosciute mediante immunostochimica in quanto, determinano una colorazione grossolanamente granulare del citoplasma e della porzione prossimale di dendriti delle cellule di Purkinje (figura n.2). Sulla base della caratteristica istochimica tale anticorpo è anche conosciuto come PCA1 (purkinje cell cytoplasmic autoantibody Type 1). Mediante metodica di WB, con lisato di cellule di Purkinje, esso riconosce due bande a 32-34 kD e 62-64 kD (figura n7). L'identificazione degli antigeni riconosciuti da tali anticorpi ha portato alla sintesi di una proteina ricombinante di 62 kD (corrispondente a cdr62) che viene attualmente utilizzata Per aumentare la sensibilità e specificità della ricerca di positività per anticorpi anti-Yo.

Antigeni-Yo

Tre geni codificanti probabili antigeni sono stati identificati mediante lo screening di una libreria di espressione di cDNA con sieri di pazienti affetti da DCP ed i prodotti genici sono stati chiamati: proteine associate alla degenerazione cerebellare [*cerebellar de generation related protein 1* (cdr1 o cdr-34) e 2 (crd2 o cdr62-1) e 3 (cdr3 o cdr62-2)] [92,93]. Cdr3 presenta notevole omologia con cdr2 per cui non è più stato studiato. Cdr1 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma X e codifica Per un polipeptide di 34 kD contenente 34 ripetizioni di 6 amminoacidi, che compongono quasi il 91% della proteina ed un motivo tipo leucine zipper. La funzione di questa proteina non è nota. Cdr2, anche conosciuto come pCD17, è localizzato sul cromosoma 16 e codifica Per un polipeptide di 62kD che presenta una regione "*leucine zipper*" vicino all'estremità ammino-terminale. Proteine contenenti un motivo tipo "*leucine zipper*" possono legarsi al DNA o formare un legame con un altro motivo "*zipper*" di un altro polipeptide formando un dimero. Non è confermato che cdr2 si leghi al DNA mentre sembra formare legami proteina-proteina. In particolare sembra legarsi all'oncogene c-myc di cui sopprime l'attività, probabilmente sequestrando lo stesso a livello citoplasmatico [94]. Tutti gli anticorpi anti-Yo hanno come bersaglio il motivo "*leucine zipper*" ed in questo modo potrebbero impedire il legame di cdr2 a c-myc [95]. Il cdr2 è

espresso nei tumori ovarici e della mammella, inoltre, mentre l'mRNA per cdr2 ha espressione ubiquitaria, solo a livello cerebrale e testicolare si ha espressione della proteina associata. Dal momento che, sia il testicolo che il cervello sono siti immunologicamente privilegiati il modello di espressione di cdr2 è a supporto dell'origine autoimmunitaria delle SNP.[96] Se la risposta immunitaria diretta contro le cellule di Purkinje sia però mediata da un meccanismo di tipo umorale o cellulo-mediato non è noto. Recentemente sono stati identificati nel siero dei pazienti con DCP la presenza di linfociti citotossici con reattività specifica per cdr2, tali linfociti sembrano inoltre avere un ruolo nello sviluppo della degenerazione delle cellule di Purkinje nei pazienti affetti da DCP [97].

Anti-Ri

Nel 1988 Budde-Steffen et al., descrissero un anticorpo diretto contro il nucleo dei neuroni del sistema nervoso centrale in un paziente con opsoclonio-mioclono e tumore della mammella, che è stato chiamato anti-Ri dalle iniziali del paziente [98]. Anticorpi anti-Ri, sono stati identificati in seguito in pazienti che si presentano con quadro a esordio subacuto caratterizzato principalmente da opsoclonio, mioclono ed atassia, in associazione preferenzialmente a tumori della mammella o del polmone (SCLC). Altre neoplasie talora correlate interessano l'apparato ginecologico e la vescica [99,100]. È importante ricordare che anticorpi anti-Ri si possono riscontrare anche nel 3% dei pazienti con SNP in assenza di tumore a un follow up maggiore di 5 anni e nel 4% dei pazienti con tumore dell'ovaio in assenza di SNP, la frequenza di tali anticorpi in pazienti con tumore della mammella o SCLC non è nota. All'immunoistochimica sono riconosciuti in quanto, colorano il nucleo più intensamente del citoplasma di tutti i neuroni, ma a differenza degli anticorpi anti-Hu, solo del sistema nervoso centrale. Sulla base delle caratteristiche immunoistochimiche sono conosciuti anche come ANNA-2 (figura n. 3). Con analisi di WB, usando estratti neuronali, tali anticorpi identificano due bande al peso molecolare di 53-61 e 79-84 kD (figura n.7). L'identificazione degli antigeni associati ha consentito di produrre una proteina ricombinante del peso molecolare di 54kD corrispondente a Nova1.

Antigeni Ri

Grazie allo screening di una libreria di espressione di cDNA di cervelletto venne riconosciuto che uno degli antigeni riconosciuti da tali anticorpi appartiene ad una famiglia di proteine leganti RNA nucleare. Tale antigene chiamato Nova-1 è una proteina, del Peso molecolare di 54 kD, legante RNA nucleare neurone specifica, composta da tre domini tipo KH (K

homology). Essa è espressa a livello del mesencefalo e della porzione ventrale del midollo spinale e questa espressione sembra ben correlare con i sintomi motori presentati dai pazienti con anticorpi anti-Ri [101]. Un secondo antigene, chiamato Nova-2, molto simile al precedente è stato in seguito identificato. Tale antigene ha un pattern di espressione sovrapponibile a quello di Nova-1 con estensione però anche ad altre strutture, e in particolare alla corteccia e talamo. Tale maggior estensione di espressione sembra correlare con la possibilità di sviluppo di demenza e labilità emotiva, in questo gruppo di pazienti [102].

Anti-glutamminco decarbossilasi

Anticorpi diretti contro la decarbossilasi dell'acido glutammico (anti-GAD) sono stati identificati per la prima volta da Solimena et al., nel 1988 in un paziente affetto da SMS, epilessia e diabete mellito di tipo I [103]. La GAD è un enzima a localizzazione presinaptica importante per la sintesi del GABA il principale neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso centrale. Questo enzima è anche espresso a livello delle cellule β pancreatiche ed è stato dimostrato essere il principale autoantigene nello sviluppo del diabete mellito insulino dipendente (DMID) e anticorpi anti-GAD sono riconosciuti nel 80% dei pazienti con DMID di recente diagnosi. Alti livelli di questi anticorpi sono stati identificati nel 60-70% dei pazienti affetti da SMS e patologie correlate (Stiff limb syndrome ed Encefalomielite progressiva con rigidità e mioclono), ma anche in pazienti con epilessia, mioclono ed atassia [104-106]. Questi anticorpi possono essere identificati mediante immunostochimica su sezioni di cervelletto di ratto reagiscono con l'ilo assonale delle cellule di Purkinje, e determinano una colorazione punteggiata a livello dello stato molecolare e granulare del cervelletto. Al WB invece riconoscono una proteina al peso molecolare di 64-65 kD. La determinazione della reattività può inoltre essere determinata con metodica RIA con GAD radio marcata [107].

Anti-amfifisina

Nel 1993 Folli et al., riportarono in tre donne affette da SMS e tumore della mammella, la presenza di anticorpi circolanti che coloravano all'immunostochimica il neuroplilo del cervelletto di ratto, risparmiando il nucleo neuronale ed il citoplasma (figura n.8). Con WB tale anticorpo riconosceva una proteina di 128 kD. De Camilli et al identificarono poi che tale proteina corrispondeva ad amfifisina una proteina delle terminazioni nervose presinaptiche con un ruolo nel meccanismo di recupero delle vescicole sinaptiche.[108, 109] Attualmente è

disponibile anche la proteina ricombinante del peso molecolare di 128 kD, per la conferma della reattività anticorpale. Anticorpi anti-amfifisina sono stati inoltre riconosciuti associati ad altre manifestazioni neurologiche tra cui Nssp, EMP, ELP e vari tumori tra cui soprattutto lo SCLC. Spesso anticorpi anti-amfifisina si ritrovano associati ad altre reattività onconeurali soprattutto in pazienti con SCLC. Nell'1% dei pazienti con SCLC possono essere inoltre presenti anche in assenza di manifestazioni neurologiche [16,17].

Anti-CV2

Nel 1993 Antoine et al., identificarono la presenza di un anticorpo in grado di riconoscere un antigene citoplasmatico espresso dagli oligodendrociti in un paziente affetto da sindrome cerebellare, uveite e neuropatia periferica e metastasi da carcinoma indifferenziato. Tale anticorpo fu chiamato anti-CV2 dalle iniziali del paziente e 2 dal numero del siero [18]. Le manifestazioni cliniche in seguito dimostrate essere associate a quest'anticorpo sono molteplici e includono: neuropatia periferica e autonoma, sindrome miastenica, atassia cerebellare, encefalite limbica, alterazione a carico dei nervi cranici, corea. I tumori più frequentemente associati sono lo SCLC e il timoma. Oltre allo SCLC e timoma anche altri tumori si possono essere stati meno frequentemente riscontrati e comprendono: carcinomi indifferenziati, sarcoma dell'utero, tumore alla prostata. È importante, inoltre, ricordare che anticorpi anti-CV2 possono essere riscontrati nel 4% dei pazienti con SNP in assenza dello sviluppo di un tumore al follow up e nel 9% dei pazienti con SCLC senza sindrome neurologica [20,110]. All'immunoistochimica, su sezioni di cervelletto e tronco encefalico di ratto, si riconoscono in quanto, colorano il citoplasma degli oligodendrociti (figura n.4) mentre con metodica di WB identificano una banda al peso molecolare di 66 kD (figura n7). L'identificazione degli antigeni associati ha permesso la produzione di una proteina ricombinante.

Antigeni-CV2

Mediante screening di una libreria di espressione di cDNA è stato riconosciuto che l'antigene identificato da tali anticorpi corrisponde ad una proteina facente parte di una famiglia di proteine del peso molecolare di circa 66 kD che sono principalmente espresse a livello del sistema nervoso chiamate CRMPs (collapse response mediator protein) La famiglia delle CRMP è composta da 5 fosfoproteine citoplasmatiche, CRMP5 è l'antigene primariamente riconosciuto dagli anticorpi anti-CV2, mentre altri membri della stessa famiglia CRMP2, CRMP3 e CRMP4 sono riconosciuti in maniera incostante. La funzione di tali proteine non è

nota ma probabilmente sono implicate nello sviluppo del sistema nervoso. Sembra, infatti, che le CRMPs siano in grado di rispondere a diversi eventi cellulari e molecolari coinvolti nell'apoptosi, nella proliferazione, nella migrazione e nella differenziazione delle cellule neurali. Queste proteine sono inoltre presenti in alte concentrazioni livello del sistema nervoso durante lo sviluppo embrionale, mentre la loro espressione è drammaticamente soppressa nel cervello adulto. CRMP2 e CPMP5 rimangono espresse in strutture che conservano la capacità di differenziazione e in una sottopopolazione di oligodendrociti ed inoltre CRMP5 è presente in un sottogruppo di neuroni sensitivi e di cellule di Schwann. Tutte le CMRPs sono infine espresse dallo SCLC [111,112].

Anti-Tr

Nel 1997 Graus et al., identificarono la presenza di un nuovo anticorpo nel siero di 5 pazienti affetti da DCP associata a linfoma di Hodgkin (LH). Tale anticorpo chiamato, anti-Tr, è riconosciuto nel 30% circa di pazienti, generalmente maschi di giovane età, con DCP associata a LH e più raramente con linfoma non Hodgkin. Inoltre sono stati riscontrati nell'11% di pazienti con DCP in assenza di tumore, mentre non sono riconosciuti in pazienti con LH senza malattia neurologica. Questi anticorpi sono identificati mediante metodica immunoistochimica in quanto, determinano una colorazione puntata a livello del citoplasma e dendriti prossimali delle cellule di Purkinje con un pattern simile a quello dimostrato con anticorpi anti-Yo, a differenza di questi ultimi, però gli anticorpi anti-Tr danno anche una colorazione diffusa e finemente puntata dello strato molecolare del cervelletto (figura n.5). per le caratteristiche immunoistochimiche quest' anticorpo è conosciuto anche come PCA-Tr (purkinje cell cytomplasic autoantibody Type-Tr). Con indagine di WB non si evidenzia alcuna banda di reazione [113]. Diversi tentativi di caratterizzazione dell'antigene non hanno fino ad ora dato risultato.

Anti-Ma2

Nel 1999 Dalmau et al., identificarono la presenza di un anticorpo diretto contro un nuovo antigene neuronale in 4 pazienti con disordini neurologici e tumore [114]. In seguito è stato dimostrato che il 95% dei pazienti, che presentano quest' anticorpo, sviluppa un quadro clinico caratterizzato dalla variabile associazione di encefalite limbica, diencefalica e del tronco che è stata prima descritta. I tumori più frequentemente riscontrati in questi pazienti sono a carico del testicolo e comprendono il tumore di tipo seminomatoso, non seminomatoso germinale e

il carcinoma in situ. Più raramente si può riscontrare tumore del polmone non a piccole cellule e altri tumori tra cui quello della mammella, parotide, ovaio, colon, rene e il linfoma [46]. All'immunoistochimica tale anticorpo colora principalmente il nucleo e nucleolo in modo puntiforme, mentre in misura minore il citoplasma dei neuroni, dove determina una lieve e omogenea colorazione (figura n. 6). Mediante metodica di WB sono state identificate due bande a 40 e 37 kD (figura n.7). L'identificazione dell'antigene associato ha permesso la produzione di una proteina ricombinante del peso molecolare di 40 kD (che corrisponde all'antigene Ma2).

Antigeni Ma

Lo screening di una libreria di espressione di cDNA cerebellare ha consentito di identificare un gene che codifica per una proteina di 37 kD che è stata chiamata Ma1. Quindi gli stessi autori identificarono un paziente con encefalite limbica e tumore testicolare che presentava nel siero un anticorpo con reattività all'immunoistochimica analoga, ma al WB si aveva reattività solo per la banda a 40 kD questo condusse ad una rivalutazione di 13 pazienti con encefalite limbica o encefalite del tronco per la presenza di anticorpi diretti contro la proteina di 40 kD. Furono allora identificati 10 pazienti positivi e fu clonato il gene associato che è stato chiamato Ma2 [44]. Pazienti con anticorpi anti-Ma (diretti contro Ma1 e probabilmente altri membri della stessa famiglia) sono in grado di identificare al WB due bande a 37 e 40 kD. I pazienti con anticorpi anti-Ma2 sono invece in grado di riconoscere solo una banda a 40. È stata identificata anche una terza proteina Ma3 che mostra una reattività a 53 kD variabile e difficile da identificare. Anticorpi diretti contro Ma2 si possono sviluppare nel 38% dei casi in associazione and anticorpi anti-Ma1 e Ma3, confrontati con pazienti che presentano solo anticorpi anti-Ma2, questi hanno un quadro clinico caratterizzato da encefalite del tronco e atassia cerebellare ed il tumore associato è più raramente testicolare. La funzione delle proteine Ma non è nota, ma il pattern di espressione a livello neuronale e testicolare così come l'analisi della sequenza proteica suggerisce che siano coinvolte nella biogenesi degli mRNA [45].

Anti-PCA2

Nel 2000 Vernino et al., riconobbero un anticorpo reagente con il citoplasma delle cellule di Purkinje nel siero dei pazienti con una sindrome neurologica caratterizzata da encefalite del tronco, encefalite limbica, atassia, neuropatia e LEMS in associazione a tumore polmonare. Tale anticorpo all'immunoistochimica riconosce il citoplasma e la porzione prossimale dei

dendriti delle cellule di Purkinje, mentre al WB era in grado di identificare una proteina del peso molecolare di 280 kD [22]. Quest'anticorpo è stato riscontrato solo da un laboratorio e l'antigene associato non è ancora stato identificato.

Anti-ANNA3

Nel 2001 Chan et al., riconobbero nel siero di 11 pazienti la presenza di un anticorpo in grado di riconoscere all'immunoistochimica i nuclei delle cellule di Purkinje e dei podociti dei glomeruli renali. Al WB tale anticorpo riconosceva una proteina di 170 kD. Il quadro clinico neurologico di tali pazienti era caratterizzato dalla presenza di disturbi multifocali generalmente subacuti e il tumore associato aveva principalmente sede polmonare. Quest'anticorpo è stato descritto in un solo laboratorio e l'antigene associato non è stato identificato [23].

Anti-Zic4

Nel 2002 Battalier et al., identificarono nel siero di un paziente con atassia cerebellare e disfunzione del tronco encefalico la presenza di un nuovo anticorpo che reagiva con proteine espresse a livello dello strato granulare del cervelletto chiamato anti-zic4 [115]. Pazienti con anticorpi anti-zic si presentano in genere con atassia cerebellare e SCLC. Nel 30% dei casi è possibile il riscontro anche di altri anticorpi, in genere anti-CV2 ed anti-Hu, nel qual caso è più probabile che il paziente sviluppi una sindrome con interessamento multifocale del sistema nervoso. Questi si riscontrano però anche nel 16% di pazienti con SCLC in assenza di sindrome neurologica paraneoplastica. Il riscontro di anticorpi anti-zic4 si basa su metodica immunoistochimica su sezioni congelate di encefalo con cui si evidenzia una reattività dei nuclei dei neuroni dello strato granulare del cervelletto e meno intensa con altri neuroni, inclusi, in ordine decrescente di frequenza: cellule di Purkinje, neuroni dei nuclei cerebellari profondi, del tronco e dell'encefalo. Mediante WB con proteine neuronali si ha il riconoscimento di multiple proteine neuronali, per cui una definitiva conferma della presenza di anticorpi anti-Zic4 è necessaria l'utilizzazione della proteina ricombinante del peso molecolare di circa 37 kD (figura n.9).

Antigene zic

Mediante screening di una libreria di espressione di cDNA furono identificati i geni codificanti per due proteine chiamate zic1 e zic4. Le proteine zic (zinc finger of the cerebellum) comprendono una famiglia di 5 proteine che svolgono un ruolo importante nello

sviluppo del sistema nervoso e che, nell'adulto, sono espresse in misura predominante a livello cerebellare [116].

Anti-SOX1

Nel 2005 Graus et al., descrissero un nuovo anticorpo chiamato anti- nucleo delle cellule gliali (AGNA= anti glial nuclear antibody) in pazienti affetti da SNP e SCLC [117].Questi autori affermarono che AGNA era un utile marcatore della presenza di SCLC in pazienti con LEMS o DCP in assenza di altri anticorpi anti-neurone. Quest'anticorpo all'immunoistochimica, su sezione di cervelletto di ratto, riconosce il nucleo delle cellule gliali di Bergmann nello strato delle cellule di Purkinje. Tuttavia tale anticorpo non venne identificato mediante WB[69]. In seguito Sabater et al., usando una libreria di espressione di cDNA di encefalo fetale identificarono che l'antigene bersaglio degli AGNA era SOX1. SOX1 appartiene a una grande famiglia di fattori di trascrizione presenti nell'età dello sviluppo mentre sono sotto regolati nella vita adulta. La famiglia dei geni SOX è classificata in gruppi da A ad H e SOX1 appartiene al gruppo SOXB1 con SOX2 e SOX3. SOX1 e SOX2 sono preferenzialmente espressi dalle cellule gliali di Bergman del cervelletto [118].

Anti-BR serina/treonina chinasi 2

Questi anticorpi sono stati descritti nel 2005 da Sabater et al., in un paziente di 61 anni che si presentava con un quadro di encefalite limbica associato al riscontro di SCLC [42]. Questi anticorpi all'immunoistochimica su sezioni di encefalo di ratto e di uomo determinavano una colorazione del citoplasma di tutti neuroni. Nel ratto si osservava inoltre una colorazione del neuropilo e dei processi prossimali di alcuni neuroni della corteccia e dell'ippocampo. Lo stesso siero determinava una colorazione delle cellule germinali del testicolo, ma non di altri tessuti, e delle cellule neoplastiche di SCLC. Mediante analisi con WB su estratti di proteine neuronali si identificavano una serie di bande al peso molecolare di circa 88-82 kD ed una banda più bassa al peso molecolare di 43 kD.

Antigene BR serina/treonina chinasi 2

Mediante screening di una libreria di espressione d'ippocampo di ratto si è ottenuta l'identificazione del gene per la BR serina/treonina chinasi 2 (BRSK2) di cui l'anticorpo riconosceva la porzione N-terminale. Anticorpi commerciali contro tale proteina hanno determinato all'immunoistochimica la stessa colorazione data dal siero del paziente e al WB hanno riconosciuto bande al peso molecolare di 85-82 kD , ma non alla banda di peso

molecolare più basso. La BRSK è una proteina molto conservata ed è un membro della famiglia delle protein chinasi attivate dall'AMP (AMPK), ma la sua funzione non è completamente nota anche se si suppone abbia un ruolo nella differenziazione neuronale [119, 120].

ANTICORPI ANTI ANTIGENI ONCONEURALI ESPRESSI A LIVELLO INTRACELLULARE

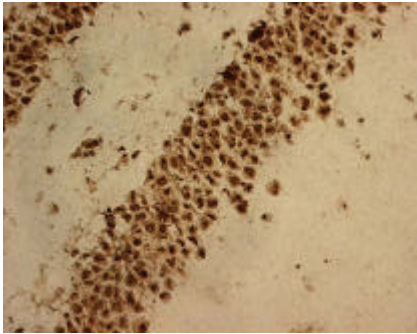


Figura n.1. **Anti-Hu.** Sezione di ippocampo di ratto (200x) dimostrante colorazione omogenea del nucleo dei neuroni cellule strato piramidale

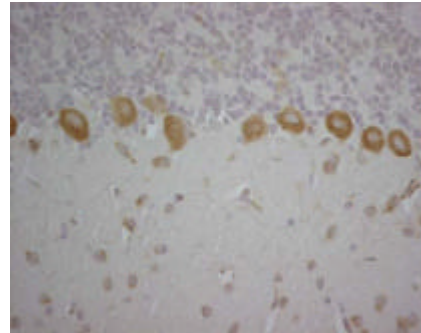


Figura n.2. **Anti-Yo.** Sezione di cervelletto di ratto (200x) dimostrante colorazione grossolanamente del citoplasma delle Purkinje.

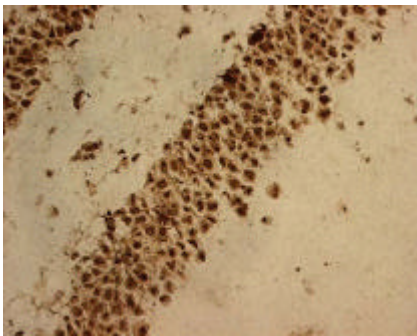


Figura n.3. **Anti-Ri.** sezione di ippocampo di ratto (200x) dimostrante colorazione omogenea del nucleo dei neuroni dello strato piramidale.

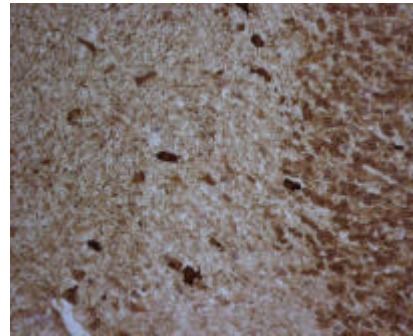


Figura n.4. **Anti-Cv2.** Sezione di cervelletto di ratto (200x) dimostrante colorazione del citoplasma degli oligodendrociti

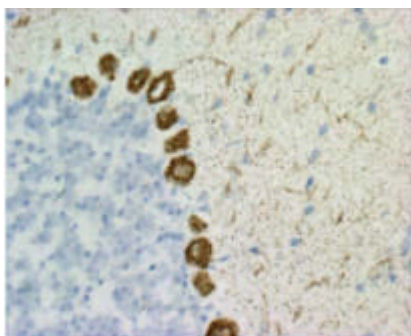


Figura n. 5. **Anti Tr.** Sezione di cervelletto di ratto (200x) dimostrante colorazione puntata del nucleo del citoplasma e della porzione prossimale dei dendriti delle cellule di Purkinje e finemente puntata dello strato molecolare.

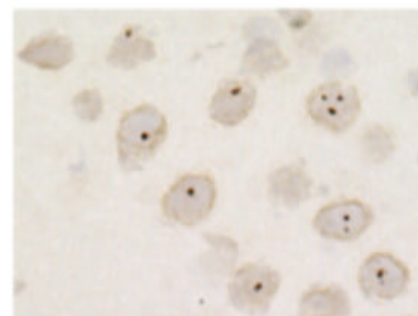


Figura n.6 **Anti-Ma.** Sezione di ippocampo di ratto (400x) dimostrante colorazione del nucleolo dei neuroni piramidali

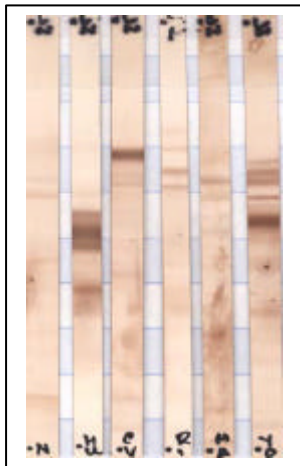
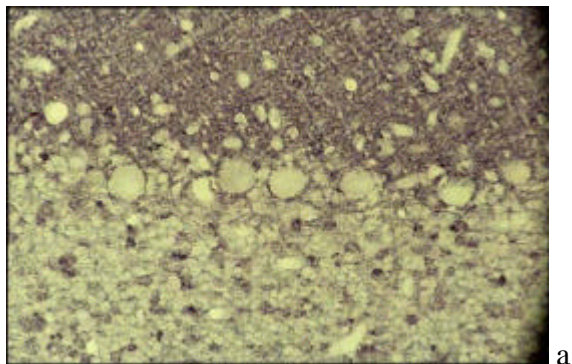
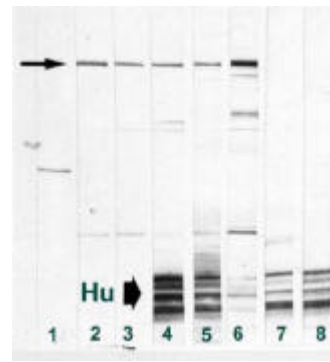


Figura n.7. **WB con estratto di cellule neuronali.** Reagenti con anti-Hu (Hu), anti-CV2 (CV), anti-Ri (Ri), anti-Ma (Ma) ed anti-Yo (Yo)



127 kDa



a

b

Figura n. 8. **Anti-amifisina.**(A) Sezione di cervelletto di ratto (200x) mostrante la colorazione del neuropilo prevalentemente evidente a livello dello strato molecolare.(B) WB con estratti di encefalo di ratto mostra la reattività per amifisina a 128 kDa alcuni sieri (4-6) possono avere anche reattività per anti-Hu

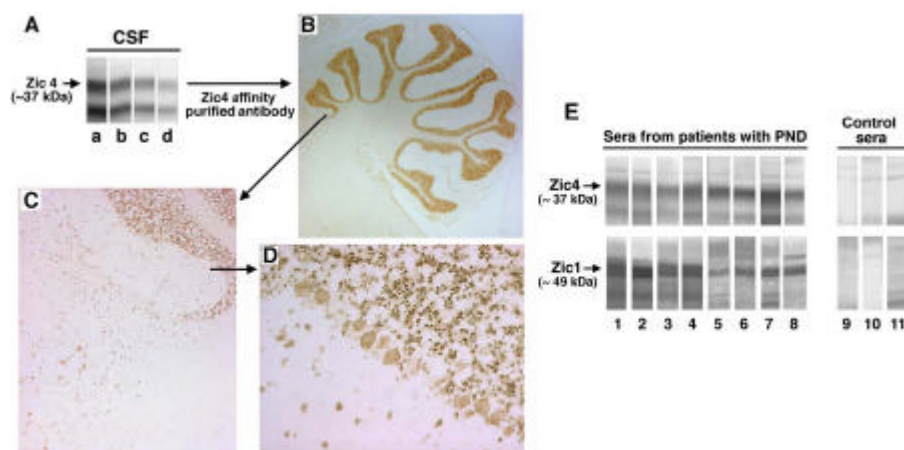


Figura n. 9 **Anti-zic.** (A) immunoblot a diverse concentrazioni di zic4 ricombinante incubato con diverse concentrazioni di liquor di paziente con degenerazione cerebellare (DCP) (a: 43.2 µg; b: 21.6 µg; c:10.8 µg; d: 5.4 µg. (B-D) immunoistochimica di cervelletto di ratto (B: 5x, C: 20x; D: 200x).(E) immunoblot con zic4 e zic1 di diversi pazienti con DCP e SCLC e di controlli negativi. Reattività contro zic 4 e zic 1 si osserva nello stesso paziente.

ANTICORPI DIRETTI CONTRO ANTIGENI DI SUPERFICIE

Anticorpi anti-canale per il calcio voltaggio dipendenti

Studi condotti tra il 1980 e il 1990 hanno dimostrato che anticorpi anti-canali per il calcio voltaggio dipendenti (VGCC-voltage gated calcium channel) sono coinvolti nella genesi della LEMS. La LEMS è una patologia autoimmune della giunzione neuromuscolare e della trasmissione sinaptica autonoma che nel 60% dei casi è paraneoplastica e associata alla presenza di SCLC. In questa patologia si ha una riduzione del rilascio di acetilcolina dalla terminazione nervosa presinaptica, secondaria alla riduzione dell'ingresso di calcio, per un blocco anticorpo mediato sui VGCC. Anticorpi anti-VGCC sono presenti nel 85-90% dei casi di LEMS e sono diretti contro i VGCC di tipo P/Q; inoltre un 40% circa dei pazienti possiede anche anticorpi diretti contro i canali di tipo N. Questi anticorpi vengono riconosciuti nel siero dei pazienti mediante una metodica di radioimmunoprecipitazione (RIA) con estratti di cervello radiomarcato con ^{125}I - α -conotossina come antigene che lega i canali per il calcio di tipo P/Q o con ^{125}I - α -conotossina GVIA, che lega i canali di tipo N. Anticorpi anti-VGCC sono riscontrati anche nel 36% dei casi di DCP associata a LEMS e SCLC in assenza di anticorpi anti-Hu, suggerendo che i primi possano essere in causa nella genesi di manifestazioni a carico del SNC [71, 121].

Anti-canali per il potassio voltaggio dipendenti

Anticorpi diretti contro i canali per il potassio voltaggio dipendenti sono stati identificati in pazienti con neuromiotonia (NMT) mediante metodica RIA con estratti di corteccia frontale marcata con ^{125}I - α -dendrotossina in grado di legare canali per il potassio (subunità di tipo kv1.1, kv1.2 e kv1.6). La NMT è una rara malattia autoimmune della giunzione neuromuscolare determinata da un blocco della ripolarizzazione della terminazione presinaptica causata da un'inibizione anticorpo mediata dei VGKC. Nel 60% dei casi questa può essere paraneoplastica e in questi casi si associa più frequentemente a timoma o SCLC. Con metodica RIA è stato dimostrato che questi anticorpi potevano essere riscontrati nel 50% dei casi di NMT, ma non nei pazienti con LEMS e miastenia gravis (MG), e che una maggiore correlazione poteva essere dimostrata nei casi associati a timoma. Tuttavia in seguito è stato dimostrato che mediante inoculazione di cRNA per le subunità kv1.1, kv1.2 e kv1.6 in oociti di *Xenopus* e successiva immunistochemica su sezioni congelate si riscontrava una positività in circa il 100% dei pazienti con NMT e che tale reattività era

soprattutto rivolta contro la subunità kv1.6 [122]. Recentemente, come già precedentemente sottolineato, è stato evidenziato che anticorpi anti- VGKC possono essere presenti anche in pazienti con manifestazioni a carico del SNC con o senza NMT. Uno studio recente condotto da Kleopa et al., ha suggerito che le diverse manifestazioni cliniche possano essere determinate da anticorpi diretti verso sub unità diverse dei canali per il potassio. In particolare si suppone che l'encefalite limbica sia correlata alla presenza di anticorpi diretti contro la subunità kv1.1, mentre diversamente da quanto precedentemente sostenuto la neuro miotonia si assocerebbe ad anticorpi diretti contro la sub unità kv1.2 [123].

La presenza di anticorpi anti- VGKC può essere evidenziata mediante immunocistochimica in cui determinano una colorazione del neuropilo dello strato molecolare dell'ippocampo di cui colorano soprattutto la porzione mediana (figura n.10), ma viene generalmente confermata mediante metodica RIA.

Anti-mGluR3

Nel 2000 Silveis Smitt et al., evidenziarono che anti recettore metabotropico per il glutammato mGluR1 erano presenti in due pazienti con atassia cerebellare e pregresso linfoma di Hodgkin. All'immunocistochimica tale anticorpo riconosce il corpo cellulare delle cellule di Purkinje e lo strato molecolare del cervelletto con un pattern puntato compatibile con il riconoscimento di spine dendritiche. Inoltre un'intensa colorazione era evidenziata a livello dei neuroni e del neuropilo del bulbo olfattorio, del tubercolo olfattorio, dello stato superficiale della corteccia cerebrale, dell'area C3 dell'ippocampo, del talamo, del collicolo superiore e del nucleo spinale trigeminale. L'iniezione di tali anticorpi nello spazio subaracnoideo del topo r determinò un quadro clinico caratterizzato da atassia cerebellare dimostrando così che tale anticorpo aveva ruolo patogenetico [124]. Tuttavia la presenza di anticorpi anti- GluR1 non è stata riconosciuta in altri pazienti e da altri laboratori.

Anticorpi anti-NMDAR

Gli anticorpi contro il recettore per il glutammato di tipo N-metil-D-aspartato sono stati identificati da Dalmau et al nel 2007 in pazienti con encefalite e teratoma dell'ovaio [77]. È stato, inoltre, dimostrato che gli anticorpi anti-dsDNA, marcatori specifici per il LES, possono reagire anche con i recettori per il glutammato di tipo N- metil-D-aspartato. Sembra, infatti, che gli anti-dsDNA si leghino alla sub-unità NR2 e possano indurre morte neuronale per apoptosi in vitro [125]. Resta tuttavia da chiarire se ci sia una specifica correlazione tra questi

anticorpi e le specifiche manifestazioni del NeuroLES. Inoltre anticorpi diretti contro la sub unità Glu ϵ 2 (la sub-unità Glu ϵ 2 del topo è omologa alla sub unità NR2B del ratto) sono stati identificati recentemente in pazienti con epilessia parziale continua, ed encefalite limbica non paraneoplastica [126, 127]. Takahashi Y nel 2008 ha dimostrato che parte degli anticorpi riconosciuti da Dalmau et al., riconoscono la porzione N terminale del Glu ϵ 2 (NRB2) [128]. Questi anticorpi all'immunohistochimica determinano una colorazione neuropilo dell'ippocampo con particolare coinvolgimento della porzione interna dello strato molecolare del giro dentato (figura n.10). La loro presenza è confermata mediante immunocolorazione di cellule renali embrionali umane (HEK293) trasfettate per esprimere un eteromero funzionale NR1/NR2B del NMDAR. I recettori di tipo NMDA sono canali cationici costituiti da un didimero formato dalla combinazione delle sub unità NR1 e NR2A-D. I recettori NMDAR sembrano avere un ruolo importante nella trasmissione sinaptica del sistema nervoso centrale e nella plasticità neuronale.

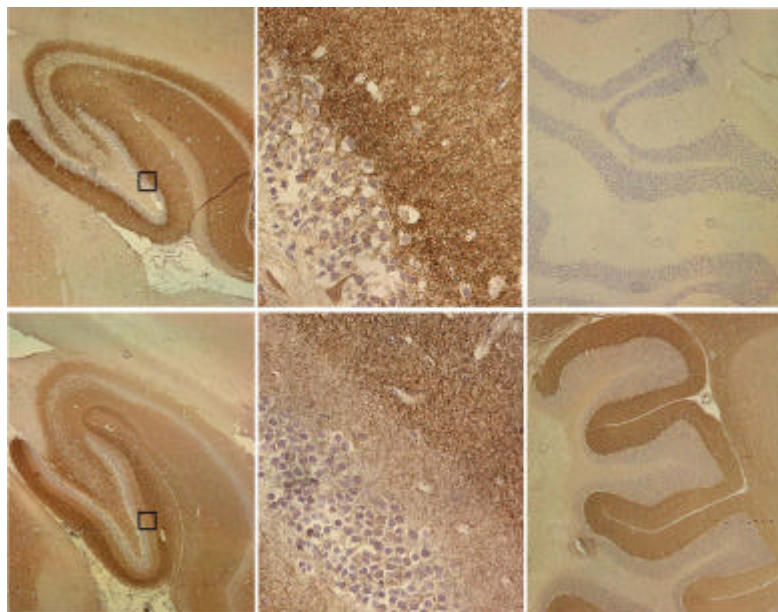


Figura n10. **Anticorpi anti-VGKC e anti-NMDAR.** Sono mostrate le reattività ottenute con anticorpi anti-NMDAR (A) e con un paziente con anticorpi anti-VGKC (B) a livello dell'ippocampo (5x) e del cervelletto (x20). Al centro ingrandimento dell'area segnata nella figura di sinistra (200x).

SCOPO DELLO STUDIO

L'encefalite limbica è stata riconosciuta inizialmente come malattia paraneoplastica tuttavia, negli ultimi anni, c'è stato un sempre maggiore interesse nei confronti di pazienti che si presentavano con un quadro clinico simile in presenza di anticorpi anti-neurone in assenza di sviluppo di un tumore la cui origine è quindi considerata autoimmune non paraneoplastica. Tuttavia le conoscenze attuali sull'ELP si basano su case reports e/o casistiche composte di un numero limitato di pazienti.

In questo studio multicentrico Europeo ci si è quindi proposti di esaminare le caratteristiche cliniche, immunologiche ed oncologiche di un'ampia coorte di pazienti affetti da ELP. Ci si è posti l'obiettivo di raccogliere informazioni il quanto più possibile dettagliate sulle caratteristiche cliniche dei pazienti valutando se era possibile definire il tipo di alterazioni neuropsicologiche e/o di crisi epilettiche presentate. Si è inoltre, voluto analizzare se le caratteristiche riconosciute nella nostra serie confermassero i dati di serie meno numerose oppure se mettessero alla luce delle peculiarità significative. In più abbiamo ci siamo posti l'obiettivo di valutare l'influenza determinata dalla presenza di segni clinici indicativi del coinvolgimento di aree diverse dal sistema limbiche sulle caratteristiche della ELP.

È noto, dalla letteratura, che nel 60% dei pazienti con ELP sono presenti anticorpi anti-neurone il cui esatto ruolo nella patogenesi della malattia non è ancora completamente conosciuto. È stato tuttavia dimostrato che alcuni di questi anticorpi sono diretti contro canali ionici. È stato quindi ipotizzato che questi anticorpi potrebbero agire, nell'ELP, causando un'interferenza nei meccanismi d'eccitabilità neuronale implicati nell'epilettogenesi e nei processi di apprendimento e memoria. Nel nostro studio si è voluto vedere se si era in grado di riconoscere in alcuni casi, in cui non si erano riscontrate reattività anticorpali già descritte in letteratura, la presenza di anticorpi che potessero essere diretti contro importanti antigeni bersaglio ed in particolare contro canali ionici.

MATERIALI E METODI

PAZIENTI

Nel 2002 è stato costituito un Network Europeo, supportato dalla Comunità Europea (QLGT-CT-2002-01756; LSSM-CT-2005 518174), per la raccolta e l'analisi dei dati relativi a pazienti affetti da SNP che è stato chiamato PNS(paraneoplastic neurological sindrome)-Euronetwork. È stato quindi costruito un database (PNS-database) in cui tutti i centri partecipanti dovevano inserire i pazienti con SNP la cui diagnosi fosse successiva all'anno 2000. Sono stati inoltre formulati dai membri del gruppo dei criteri diagnostici per le SNP che potessero supportare i membri stessi, ma che fossero di aiuto anche per tutti i clinici, nella diagnosi delle SNP [129]. Nel nostro studio dei 917 pazienti inseriti nel PNS-database fino al settembre 2008 sono stati considerati solo i pazienti affetti da ELP. Di questi pazienti dovevano essere presenti adeguate informazioni cliniche neurologiche e oncologiche, laboratoristiche, di neuro immagine e immunologiche. Quando non sono state trovate informazioni adeguate sono state prodotte specifiche queries che sono state inviate ai singoli centri. In alcuni casi si è eseguita una rivalutazione in loco i dati clinici dei singoli pazienti inseriti da alcuni centri europei. Le informazioni cliniche sono state visionate previa rimozione dei dati sensibili in accordo con le leggi nazionali vigenti dei singoli paesi Europei,

ANALISI DELLE REATTIVITÀ ANTICORPALI

IMMUNOISTOCHEMICA

Preparazione del tessuto

Ratti adulti, tipo Sprague-Dawley, sono stati anestetizzati e uccisi mediante decapitazione. Il cervello è stato quindi rimosso e sezionato sagittalmente. Tessuto non fissato è stato ottenuto mediante immersione dei blocchi sagittali in OCT (Optimal Cutting Temperature) e successivo congelamento degli stessi in isopentano e azoto liquido. Mentre, tessuto fissato in paraformaldeide (PFA) è stato ottenuto immergendo i blocchi sagittali di cervello in paraformaldeide al 4% per dieci giorni, in saccarosio, al 30% in tampone salino fosfato (PBS) Per 48 ore, a scopo crioprotettivo, e quindi in OCT. Queste sono poi state congelate mediante

immersione in isopentano ed azoto liquido. Blocchi di tessuto non fissato e fissato in PFA sono stati conservati a -80° C fino all'uso.

Immunoistochimica

Mediante criotomo sono state ottenute sezioni di spessore di 7µm, di tessuto non fissato e fissato in PFA, che sono state utilizzate per lo studio immunoistochimico. Le sezioni non fissate sono poi state incubate in acetone o metanolo-acetone a 4° C Per 10 min. Quindi entrambi i tipi di sezione sono stati incubati in seguito con perossido d'idrogeno 0.25% in PBS Per 15min, per prevenire l'azione della perossidasi endogena, con siero di agnello 10% in PBS Per 30 min, per bloccare l'attività anticorpale aspecifica, con siero dei pazienti (diluito 1:500 in siero di capra) e/o il liquor (diluito 1:10 in siero di capra) per la notte, con anti-IgG umane biotilate fatte in agnello (diluite 1: 2000 in siero di capra) per 2 ore e complesso avidina-biotina-perossidasi per 1 ora. Ogni incubazione è stata preceduta da 3 lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno. La reattività è stata quindi sviluppata con diaminobenzidina (DAB). Il tessuto pre-fissato in PFA richiedeva tempi di esposizioni più lunghi (10-12 min) di quelli del tessuto non prefissato (2-3 min).

WESTERN BLOT

Estratti di proteine neuronali umane sono stati ottenuti come descritto da Dalmau et al. [130], e separate mediante elettroforesi in un gel 12% di sodio-dodecil solfato-policrilamide e trasferito in nitrocellulosa. Le membrane di nitrocellulosa sono poi state incubate con 5% latte secco tipo Carnation e 10% siero di agnello per bloccare la reattività aspecifica. La membrana è stata quindi tagliata in striscioline di 5 mm ciascuna e ognuna di questa incubata con il siero del paziente (diluito 1: 1000 in siero di capra) per 12 ore, con anti-IgG umane coniugate con biotina (diluite 1:2000 in siero di capra) per 2 ore e complesso avidina-biotina per 1 ora. Tra ogni incubazione, tre lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno sono stati effettuati. La reazione è stata quindi sviluppata con 0.05% DAB con 0.5% Triton X e 0.01% perossido d'idrogeno in PBS.

IMMUNOBLLOT

La tecnica d' immunoblot per la ricerca di anticorpi anti neurone è stata effettuata utilizzando il kit commerciale Ravo PNS-blot. Tutti i componenti del kit sono stati portati a temperatura ambiente prima dell'uso. Il tampone è stato diluito 1:20 in acqua distillata. I sieri dei pazienti

sono stati diluiti 1:10 con diluente per campioni già pronto all'uso. Poste le strisce di nitrocellulosa nelle apposite corsie di incubazione, si sono aggiunti 2 ml di tampone di diluizione in ogni corsia. In seguito sono stati aggiunti 10 µl di siero prediluito (ottenendo una diluizione finale dei campioni di 1:2000); l'incubazione del siero del paziente è stata mantenuta per 60 minuti su agitatore rotante. Dopo 5 lavaggi con tampone diluito, ad ogni striscia sono stati aggiunti 2 ml di coniugato di IgG-fosfatasi alcalina pronto per l'uso, per 30 minuti su agitatore rotante. Dopo ulteriori 5 lavaggi, le strisce sono state incubate per 25 minuti con 2 ml di substrato pronto all'uso. Infine sono state lavate con acqua distillata per bloccare la reazione, asciugate e interpretate su apposito supporto cartaceo.

RADIOIMMUNOPRECIPITAZIONE

Si è utilizzata α -dendrotossina marcata con ^{125}I come ligando selettivo per i VGKC. Un omogenato estratto da cervello di ratto è stato utilizzato come sorgente di VGKC. Le aliquote di omogenato sono state incubate con una concentrazione ^{125}I - α -dendrotossina (1 nM). 5µl di siero da testare diluiti 1:10 in PBS 20 nM (pH 7.4) e Triton X-100 allo 0.1% (buffer PTX) sono stati aggiunti a 50 µL di estratto di cervello. Dopo un'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 100 µL di IgG di capra anti- IgG umane (diluite 1:1 in PTX). Un mL di PTX è stato aggiunto dopo la formazione del precipitato e la soluzione così ottenuta è stata centrifugata a 13000 giri/min per 3 minuti. Le provette sono state lavate due volte in PTX e inserite in un contatore gamma. I risultati sono espressi come picomoli di ^{125}I - α -dendrotossina precipitate per litro di siero (pM) dopo sottrazione della media di tre controlli sani. Questa metodica è stata utilizzata solo per alcuni sieri in cui si sospettava la presenza di anticorpi anti-VGKC ed è stata eseguita presso il Weatherall Institute of Molecular Medicine dell'Università di Oxford, nel laboratorio diretto dalla prof. A.Vincent ad Oxford (Gran Bretagna).

IMMUNOCITOCHIMICA

Le colture ippocampali sono state preparate partendo da ratti Wistar neonati. I ratti al primo o secondo giorno di vita sono stati anestetizzati e sacrificati. Prelevati gli encefali, si è proceduto alla rimozione degli ippocampi. I preparati sono stati posti in tripsina 0.05% Per 30 minuti. Le cellule derivate dal lisato sono state disposte su copri vetrini coperti con poli-L-lisina in siero di cavallo al 10%. Dopo 3 ore il siero è stato sostituito con Neurobasal Medium (Invitrogen). Quindi, le cellule sono state lasciate crescere a 37°C al 5% CO₂ per 21 giorni.

Per determinare se gli antigeni bersaglio fossero accessibili ai neuroni in vitro le IgG dei pazienti (diluiti 1:500) sono state aggiunte a colture neuronali per 1 ora. In seguito i neuroni sono stati lavati gentilmente con PBS e fissati in PFA4%. L'eventuale legame anticorpale è stato evidenziato con IgG anti-immunoglobuline umane fluorescinate (diluizione 1:2000) incubate per 30 minuti. Neuroni incubati con IgG normali od IgG dirette contro antigeni intracellulari (anti-Hu), che si supposeva non dovessero dare reattività, sono state usate come controllo. I vetrini sono stati montati in medium acquoso ed osservati al microscopio a fluorescenza.

IMMUNOCITOCHIMICA SU CELLULE HEK-293 TRANSFETTATE

Per l'immunocitochimica su linea cellulare transfettata si è utilizzata la linea HEK-293 (human embryonic Kidney-293) conservata a -80° . Essa cresce in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con aggiunta di siero fetale di vitello (FCS) al 10%. In un piatto di otto pozzetti si sono posti 3 vetrini corpioggetti per pozzetto. I vetrini sono stati trattati con poli-lisina fresca per 15 minuti, si è aspirato il contenuto e si sono lasciati a seccare sotto cappa. Quindi, si sono aggiunte le cellule ($2 \times 10^5/\text{mL}$). Dopo 6-8 ore si è aspirato il medium e ne è stato aggiunto di fresco. In seconda giornata si è controllata al microscopio la crescita delle cellule valutandone la forma e confluenza e la presenza di precipitati. In terza giornata si è proceduto alla transfezione del DNA. A questo scopo si sono cotransfettati plasmidi contenenti le sub unità eccettoriali NR1 e NR2B e la proteina fluorescente GFP. Come controllo negativo si è transfettato anche un vettore vuoto. Per la transfezione si sono utilizzati $3\mu\text{g}$ di DNA, $1\mu\text{g}$ di glucosio al 20% ed $1.2\mu\text{l}$ di polietilammina (PEI) in 2mL di DMEM per pozzetto. In quarta giornata si è verificata l'avvenuta transfezione (espressione di GFP) al microscopio a fluorescenza. Si è quindi proceduto all'immunocolorazione trasferendo i copri vetrini in un piatto di 24 pozzetti ed aggiungendo la soluzione di lavaggio (DMEM+ HePFs $0.46\text{g}/100\text{ml}$) e si sono eseguiti 3 lavaggi. Le cellule sono quindi state fissate con $250\text{-}300\mu\text{l}/\text{pozzetto}$ di formaldeide (3% PBS) a temperatura ambiente per 15 minuti. Si è aspirata la soluzione in eccesso e lavato con PBS per una volta e con soluzione di lavaggio per 2 volte. Si è in seguito aggiunto il siero del paziente (1:100) e gli anticorpi monoclonali (subunità NR1 ed NR2B (Chemicon International) diluiti 1: 1000 ed 1: 2000) che sono stati incubati overnight a 4°C . In seguito dopo 4 lavaggi (3 con soluzione di lavaggio ed una con PBS) è stato incubato per 45 minuti l'anticorpo secondario coniugato con fluoresceina (1:750). Dopo 3 lavaggi con soluzione di lavaggio e due con PBS i vetrini sono stati montati con DAPI e

medium apposito e la reattività valutata con microscopio confocale. Le metodiche immunochitochimiche sono state da noi eseguite su di un unico siero di cui si è voluta caratterizzare la reattività. Tali indagini sono state eseguite da noi presso il Weatherall Institute of Molecular Medicine dell'Università di Oxford, nel laboratorio diretto dalla prof. A.Vincent ad Oxford (Gran Bretagna).

ANALISI STATISTICA

Termini proporzionali sono stati utilizzati come statistica descrittiva per variabili categoriche e media e mediana per variabili continue. per confrontare variabili qualitative sono stati utilizzati il test Chi-Quadro ed il test di Fisher, mentre per variabili quantitative è stato utilizzato il test t-Student o di Wilcoxon. Le analisi della sopravvivenza sono state ottenute attraverso il metodo di Kaplan Mayer e le differenze confrontate attraverso il Log-rank test. Le analisi sono state eseguite mediante SAS (versione 9.02, SAS system, Cary NC).

RISULTATI

ENCEFALITE LIMBICA PARANEOPLASTICA

Nel PNS-database a oggi sono stati inseriti 917 pazienti, di cui 477 avevano una sindrome paraneoplastica con interessamento del SNC (tabella 2) e di questi ultimi 104 hanno dimostrato di avere segni d'interessamento del sistema limbico e sono stati inclusi nel nostro studio. La distribuzione dei casi presentatesi ai centri di riferimento è stata la seguente: Padova-Treviso 6 casi, Torino 2, Roma 1, Chiari 1, Parigi 10, Lione 33, St Etienne 1, Vienna 7, Barcellona 16, Oxford 1, Liverpool 3, Monaco 14, Lubiana 3, Rotterdam 2, Leiden 1, Berna 3. (figura n.11)

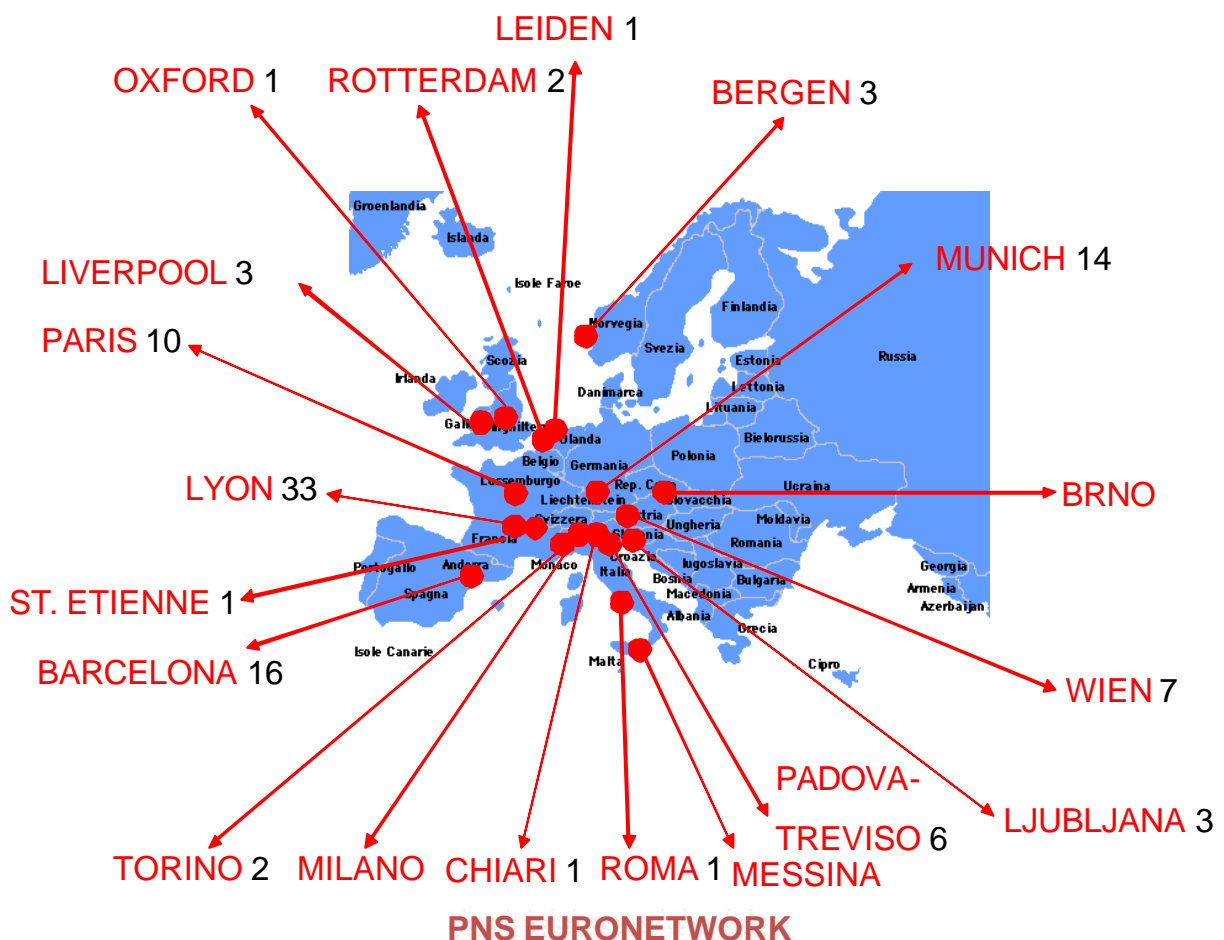


Figura n.11. Distribuzione dei casi di encefalite limbica paraneoplastica inseriti nel PNS-database per centro

Tabella n.2. **Sindromi neurologiche paraneoplastiche con interessamento del sistema nervoso centrale**

| SINDROME | NUMERO PAZIENTI |
|--------------------------------|-----------------|
| Degenerazione cerebellare | 214 |
| Encefalite limbica | 104 |
| Encefalomielite | 51 |
| Encefalite del tronco | 51 |
| Opsoclono mioclono | 25 |
| Retinopatia associata a tumore | 4 |
| Sindrome della Persona Rigida | 6 |
| Mielopatia necrotizzante | 2 |
| Malattia del motoneurone | 20 |

I pazienti erano 66 maschi e 38 femmine (rapporto maschi/femmine 1.7:1) ed avevano età media paria 59.5 anni (range 9-84 anni) mediana 61.5.

SINDROME CLINICA

Il quadro clinico si presentava con l'esordio subacuto di una sindrome caratterizzata da almeno uno fra i seguenti sintomi: crisi epilettiche, stato confusionale, deficit di memoria, problemi psichiatrici.

Crisi epilettiche: sono state riscontrate in 46 pazienti su 104. In 17/46 pazienti le crisi avevano caratteristiche di crisi parziali complesse d'origine temporale, crisi epilettiche generalizzate sono state invece riscontrate in 14/46 casi di cui in 6 casi si trattava di forme secondariamente generalizzate. In 15/46 pazienti le crisi erano di tipo parziale motorio. Per 10 di questi pazienti era disponibile l'esame elettroencefalografico che in 6 casi ha dimostrato la presenza di onde puntute a sede fronto-temporale. In 3 casi il quadro era determinato da uno stato di male epilettico. Mentre per 3 casi era riportata la presenza di crisi epilettiche senza che fosse specificata la tipologia della crisi. In tutti i casi, le crisi sono state controllate dalla terapia farmacologica tranne che in due pazienti che hanno presentato crisi epilettiche intrattabili. In uno dei due casi le crisi erano di tipo parziale complesso, mentre nell'altro di tipo parziale semplice. Si trattava di due pazienti di sesso maschile di giovane età, 32 e 34 anni

rispettivamente, con riscontro su siero di anticorpi anti-Ma2 e associato tumore testicolare in uno dei due casi, mentre nell'altro, non è stata riconosciuta la presenza di tumore a un follow up di 2 anni. In entrambi i pazienti si sono riscontrate allo studio di RNM encefalica alterazioni di segnale nelle sequenze a TR lungo in sede temporale mesiale unilaterale ed entrambi sono stati sottoposti a trattamento chirurgico per l'epilessia. L'esame istologico del prelievo bioptico disponibile per solo uno dei due pazienti ha confermato la presenza di un quadro compatibile con encefalite limbica per la presenza di perdita neuronale, noduli microgliali e infiltrato infiammatorio a cellule T.

Compromissione delle funzioni cognitive: Si caratterizzava principalmente per il riscontro di deficit della memoria e disorientamento spazio temporale. Un deficit della memoria è stato riscontrato in 80/104 pazienti. Il deficit riguardava la capacità di apprendimento di nuovi eventi (deficit di memoria anterograda) con coinvolgimento parziale anche della memoria retrograda relativa agli eventi più recenti. Mentre un disorientamento spazio temporale (S/T) è stato riscontrato in 41 pazienti. Altre manifestazioni sono state: sindrome disesecutiva riscontrata in 6 pazienti, deficit di attenzione 4 pazienti e rallentamento ideomotorio 5 pazienti.

Sintomi psichiatrici: si caratterizzavano principalmente per modificazioni della personalità e alterazioni del tono dell'umore. Alterazioni della personalità sono state riscontrate in 30 pazienti. Alterazioni del tono dell'umore sono state riscontrate maggiormente sul versante depressivo con identificazione di una sindrome depressiva in 18 pazienti, alterazioni dell'umore di tipo euforico sono state riscontrate invece in solo 3 pazienti. Quadri di ansia e agitazione sono invece stati identificati in 18 pazienti. Mentre raramente si sono riscontrati quadri di allucinazione visiva (n=3), o franca psicosi (n=1).

Stato confusionale: la presenza di un quadro clinico caratterizzato da stato confusionale non altrimenti specificato è stata riscontrata in 57 pazienti.

Tabella n.3. **Caratteristiche cliniche dei pazienti con Encefalite limbica paraneoplastica**

| | |
|---------------------------------------|-------|
| Esordio subacuto | 100% |
| Deficit della memoria a breve termine | 77% |
| Stato confusionale | 54.8% |
| Sintomi psichiatrici | 52.8% |
| Crisi epilettiche | 44.2% |

In 49 pazienti sono stati riscontrati segni e/o sintomi indicativi del coinvolgimento di altre aree oltre al sistema limbico. Questi sintomi riportati in tabella n4 ci hanno fatto considerare questo gruppo di pazienti come affetto da una forma di ELP che abbiamo definito “plus” per differenziarla dalla forma “pura” nella quale invece, non sono stati riscontrati altri segni clinici al di fuori di quelli sopra riportati.

Tabella n.4. **Segni clinici aggiuntivi nelle forme di ELP “plus”**

| | |
|---|--------------------|
| Atassia cerebellare | 15 pazienti |
| Neuropatia | 11 pazienti |
| Neuronopatia sensitiva | 6 |
| Neuropatia sensitivo-motoria | 4 |
| Neuropatia sensitiva | 1 |
| Poliradiculonevrite | 1 |
| Segni e sintomi di interessamento del tronco | 9 pazienti |
| Oftalmoplegia | 4 |
| Paralisi sopranucleare dello sguardo | 3 |
| Nistagmo | 2 |
| Vertigine | 1 |
| Ipoventilazione centrale | 2 |
| Altri nervi cranici | 3 |
| Disautonomia | 8 pazienti |
| Ipotensione ortostatica | 2 |
| Pseudo ostruzione intestinale cronica | 7 |
| Alterazione frequenza cardiaca | 1 |
| Segni di interessamento corticospinale | 7 pazienti |
| Disturbi del sonno | 2 pazienti |
| Disturbi del movimento | 2 pazienti |
| Corea | 1 |
| Mioclonia | 1 |
| Patologia di placca neuromuscolare | 2 pazienti |
| Sindrome miastenica di Lambert Eaton | 1 |
| Neuromiotonia | 1 |

LATENZA DIAGNOSTICA

La latenza diagnostica definita come l'intervallo di tempo fra l'esordio dei sintomi e la diagnosi di malattia è risultata in media pari a 4.18 mesi (range 3 giorni-28 mesi) con una mediana di 2 mesi.

TUMORE

Una neoplasia è stata riscontrata in 96 pazienti. La diagnosi di tumore è stata eseguita in 74 pazienti dopo il riconoscimento della sindrome paraneoplastica con un tempo mediano di 2 mesi (range 0.5-23 mesi). In 22 pazienti la diagnosi di tumore era antecedente alla diagnosi della sindrome neurologica con un tempo mediano di 6 mesi (range 0.5-132 mesi). In due pazienti la diagnosi di tumore era anamnesticamente e risaliva in un caso di SCLC a 10 anni prima dell'esordio della ELP e a 11 anni prima in un caso di linfoma non Hodgkin (NHL). In entrambi i casi erano stati riscontrati anticorpi anti-neurone: anti-Hu nel primo caso ed anti-Ma2 nel secondo caso.

Il tumore più frequentemente riscontrato era quello del polmone, che è stato diagnosticato in 54 pazienti, il cui istotipo più frequente, è stato lo SCLC che è stato riscontrato in 41 pazienti. Il secondo tumore per frequenza era quello testicolare riscontrato in 11 pazienti, seguito dal tumore della mammella riscontrato in 5 pazienti, il linfoma di Hodgkin (LH) 3 casi, timoma 3 casi, tumore dell'ovaio 3 casi. Gli altri tumori riscontrati sono riportati in tabella n 5.

La stadiazione di malattia non era disponibile in 3 pazienti. Nei restanti 91 pazienti (si sono esclusi quelli con tumore aneddatico) si è osservato che: 42 pazienti avevano stadio limitato all'organo bersaglio, 30 avevano interessamento loco regionale dei linfonodi e 16 avevano metastasi a distanza di cui 3 pazienti avevano metastasi con primitivo a sede non nota, 3 pazienti avevano LH di stadio III (n=2) e II (n=1) secondo la stadiazione di Ann Arbor.

Tabella n.5 **Tipi di tumore riscontrati nell'ELP e loro stadio.**

| Tipo di tumore (numero di casi) | Stadio locale | Coinvolgimento dei linfonodi regionali | Metastatico | Non valutabile | Stadiazione Ann Arbor |
|--|--------------------------|---|--------------------|---------------------------|----------------------------------|
| SCLC (41) | 12 | 22 | 6 | 1 | |
| NSCLC (13) | 5 | 4 | 3 | 1 | |
| Testicolare (10) | 7 | 1 | 1 | 1 | |
| Seminoma mediastinico | 1 | | | | |
| Mammella (5) | 4 | 1 | | | |
| Timoma(3) | 1 | 1 | 1 | | |
| LH (3) | | | | | Stadio III (2) Stadio II (1) |
| Ovaio (3) | 2 | | 1 | | |
| Esofago (2) | 1 | | 1 | | |
| Gastrico (2) | 2 | | | | |
| Colon (1) | 1 | | | | |
| Rene (2) | 2 | | | | |
| Vescica (1) | 1 | | | | |
| Prostata (1) | 1 | | | | |
| Neuroblastoma (1) | 1 | | | | |
| Melanoma (1) | 1 | | | | |
| NHL (1) | | 1 | | | |
| Metastasi a primitivo non noto (3) | | | 3 | | |

SCLC= small cell lung cancer (a piccole cellule); NSCLC= non small cell lung cancer (non a piccole cellule); LH= linfoma di Hodgkin, NHL= linfoma non Hodgkin.

Un tumore non è stato riscontrato in 10 pazienti; sono stati inclusi in questo gruppo anche due pazienti che avevano una storia remota di neoplasia senza dimostrazione di ripresa di malattia. Di questi 4 sono deceduti come conseguenza della malattia neurologica e non disponiamo di dati autoptici che ci permettano di escludere con certezza la presenza di un tumore. Dei

restanti 6 pazienti solo in un caso abbiamo un follow up sufficientemente lungo da permetterci di considerare poco probabile un'identificazione futura della neoplasia. Si tratta di una donna di 56 anni con un quadro clinico caratterizzato da crisi epilettiche parziali complesse a origine temporale e deficit della memoria anterograda. La paziente presentava inoltre una sindrome intestinale pseudoostruttiva e una neuropatia assonale sensitivo-motoria. In questa paziente sono stati riscontrati anticorpi anti-Ri, l'esame del liquor mostrava segni d'infiammazione con 140 proteine mg/dl e presenza di bande oligoclonali. Alla RNM encefalica si erano inoltre riscontrate alterazioni bilaterali nelle sequenze a TR lungo a livello ippocampale bilaterale. La paziente è stata trattata con terapia steroidea (metilprednisone 1 gr/die per 5 giorni) senza che si avesse alcun miglioramento clinico che si è invece ottenuto con l'introduzione di terapia immunosoppressiva (ciclofosfamide). All'ultimo follow up, a otto anni dall'esordio clinico, presentava una qualche restrizione delle attività della vita quotidiana, ma senza impedire un'esistenza totalmente indipendente ed il punteggio alla scala di Rankin modificata (mRS) era pari a 4.

ANTICOPRI ANTI NEURONE

Gli anticorpi anti neurone sono stati ricercati sul siero in tutti i pazienti e sono risultati presenti in 91 casi. Sul liquor sono erano positivi in tutti i 18 pazienti per i quali l'informazione era disponibile. L'anticorpo più frequentemente riscontrato era l'anti-Hu identificato in 51 pazienti, seguito dall'anti-Ma2 presente in 22 pazienti. Altre reattività riportate sono state: anti-Ri (n=4), anti-amfifisina (n=4), anti-CV2 (n=3), anti-VGKC (n=2) ed anti-NMDAR (n=2). In casi singoli è stata riscontrata una positività Per anti-VGCC e anti-Tr. Inoltre in 2 casi si sono identificati più anticorpi: 1 caso con Hu associato ad anticorpi anti-amfifisina e un caso con anticorpi anti-Ri, anti-CV2 ed anti-Hu ed in entrambi questi due casi il tumore associato era lo SCLC.

ESAME DEL LIQUOR

L'esame del liquor è stato eseguito in 83 pazienti. In base ad un consenso fra i membri del gruppo europeo è stato considerato come patologico un esame del liquor che abbia un numero di cellule superiore a 5 globuli bianchi/mm³ e/o un contenuto proteico maggiore di 50 mg/dl e/o la presenza di bande oligoclonali. Usando questi parametri, abbiamo riscontrato che 25 pazienti avevano un esame liquorale normale. In tutti gli esami effettuati è stato valutato il numero di cellule che era in media 15.2 cell/mm³ (range 0-208) con una mediana di 5 cellule.

Il contenuto proteico è stato esaminato in 78 esami e la concentrazione proteica media era pari a 97.5 mg/dl (range 10-910) con mediana di 55 mg/dl. La presenza di bande oligoclonali è stata analizzata in 37/83 casi ed erano positive in 21.

Per descrivere le anomalie del liquor nel tempo abbiamo confrontato su di un grafico (figura. 12) il contenuto cellulare o proteico (posti nell'asse y) e il tempo fra l'esordio della sindrome neurologica (sull'asse delle x). Il liquor è stato eseguito in media 2.71 mesi (range 3 giorni-18 mesi) dopo l'esordio della sindrome neurologica con una mediana di un mese. In 65/82 pazienti l'esame del liquor è stato eseguito a meno di 3 mesi dall'esordio clinico (range 3 gg-3 mesi) in questi pazienti il numero medio di cellule era pari a 16.9 cellule/mm³ (range 0-208) con un numero mediano di 5 cellule, mentre il contenuto proteico era pari a 92,2 mg/dl (range 10-480) con un mediana di 55 mg/dl. In 18 pazienti l'esame del liquor è stato eseguito a più di 3 mesi dall'esordio. In questi pazienti il contenuto cellulare era in media pari a 9 cellule/mm³ (range 0-32) con una mediana di 4 cellule/mm³. Il contenuto proteico invece era pari a 117,6 mg/dl (range 30-910) e con valore mediano di 49,5 mg/dl. La presenza di bande oligoclonali è stata riscontrata in 13 casi in cui il liquor è stato eseguito a meno di 3 mesi contro 8 casi in cui è stato eseguito a più di 3 mesi.

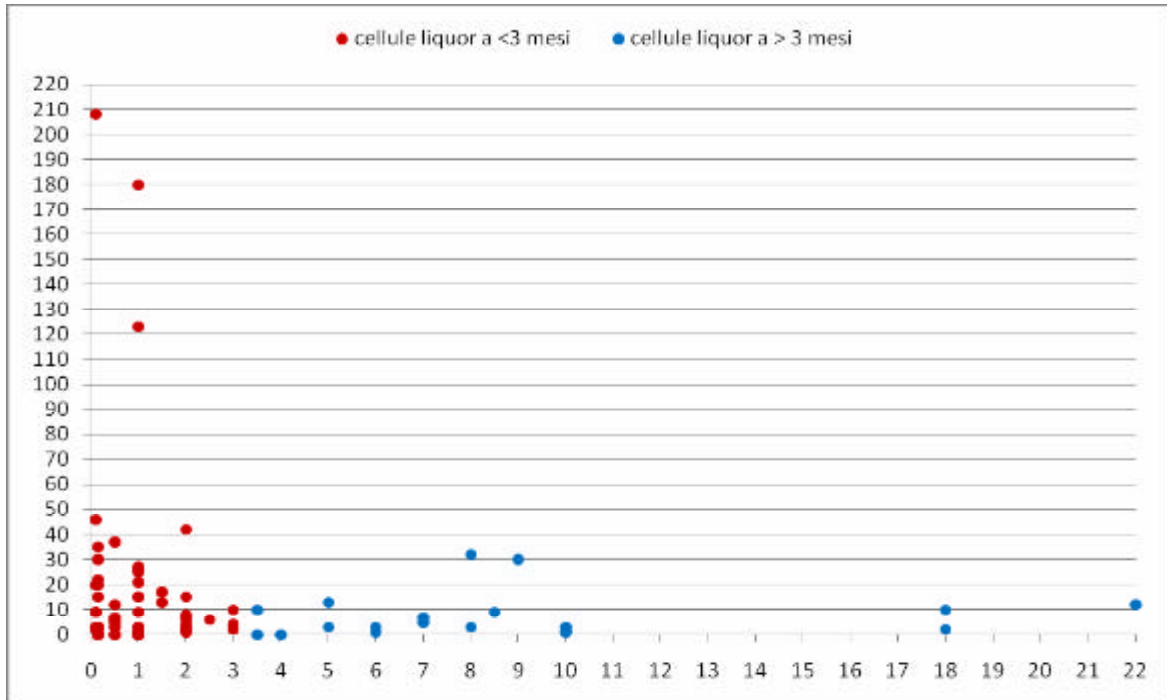


Figura 12. **Cellule sul liquor in funzione del tempo di esecuzione dell'esame del liquor.** In ascissa viene riportato il numero delle cellule mentre in ordinata il tempo in mesi.

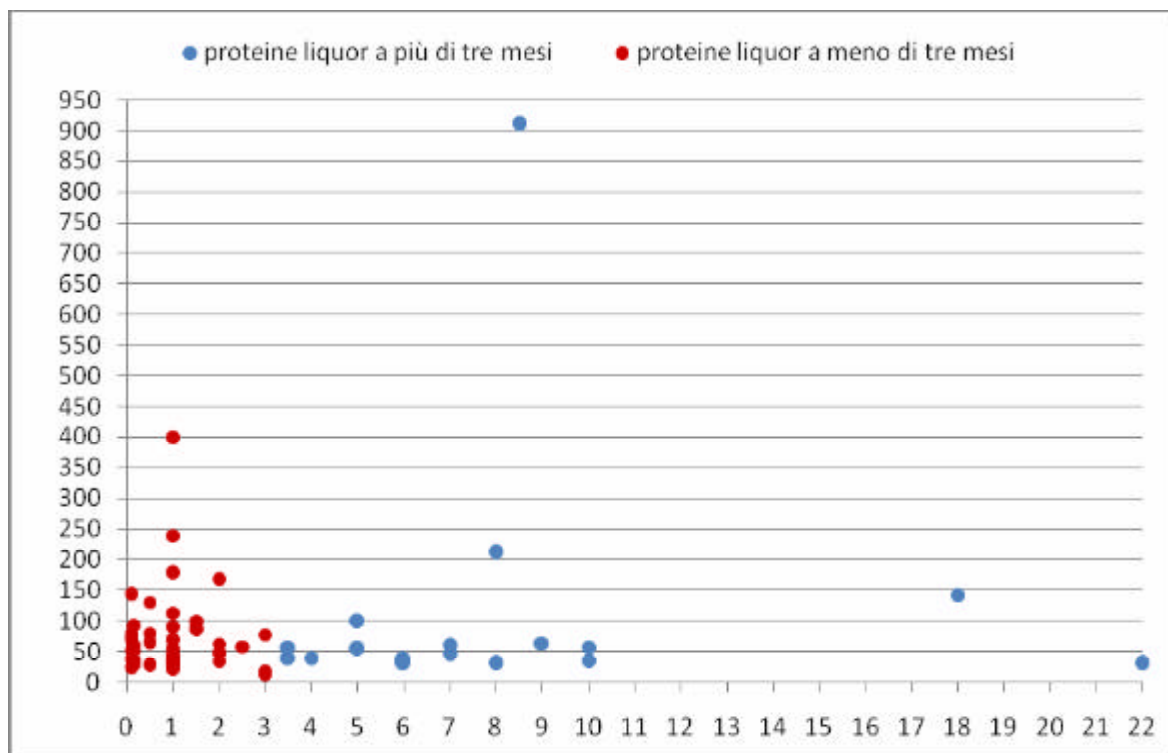


Figura n.13. **Proteine sul liquor in funzione del tempo di esecuzione dell'esame.** Sull'asse delle ascisse è riportata la concentrazione proteica in mg/dl e su quello delle ordinate il tempo in mesi.

RISONANZA MAGNETICA

Dati inerenti l'esecuzione della RMN encefalica erano disponibili in 101/104 pazienti. L'intervallo di esecuzione dell'esame dall'esordio dei sintomi era pari a 2,24 mesi (range 3 giorni-20 mesi) con mediana a un mese. La RNM encefalica è risultata normale in 27 pazienti, in 3 di questi pazienti è stata eseguita una PET cerebrale che ha mostrato un ipermetabolismo in regione temporale mesiale. Nei 74 pazienti in cui era patologica si sono riscontrate alterazioni a livello ippocampale in 71 pazienti. L'ippocampo era coinvolto bilateralmente in 52 casi, mentre unilateralmente in 19 (figura n.14). Le alterazioni ippocampali erano evidenziabili nelle sequenze a TR lungo in tutti i pazienti, mentre nelle sequenze T1 in 16 pazienti ed acquisizione di mezzo di contrasto si aveva in 12 pazienti. In 11 pazienti si è evidenziato il coinvolgimento di altre zone al di fuori dell'ippocampo ed in 3 pazienti si sono riscontrate alterazioni solo in altre sedi (in un caso si trattava di lesioni multiple descritte simil vasculitiche, ed in un altro caso bi occipitali e fronto-parietali ed un caso frontali basali bilaterale).

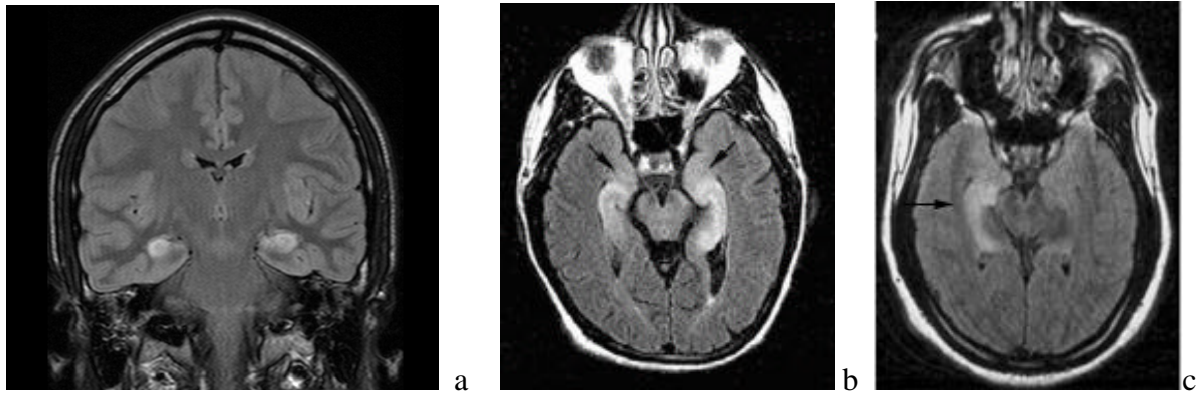


Figura n.14. **RNM encefalica.** Sezioni coronale (a) e assiale (b) in flair. si evidenziano alterazioni ippocampali bilaterali (a,b) ed unilaterali (c)

TERAPIA

46 pazienti sono stati trattati con farmaci immunomodulatori. Il trattamento è stato eseguito in mediana a 1.25 mesi dall'esordio della sindrome neurologica (range 5 giorni-17 mesi dopo). In 39 pazienti sono stati utilizzati corticosteroidi in 28 casi da soli, mentre in 7 casi associati a immunoglobuline Per endovena (IVIg), un caso a terapia immunosoppressiva (ciclofosfamide), un caso con plasmateresi (PA) e 2 casi con PA e IVIg. Dei pazienti trattati 16 hanno presentato un miglioramento clinico. Di questi 12 sono stati trattati con soli steroidi, 3 con steroidi e IVIg e 1 con steroidi IVIg e PA. Un paziente trattato con steroidi e immunosoppressori ha risposto al trattamento immunosoppressivo ma non a quello con steroidi. Due pazienti sono stati trattati con sole IVIg, 2 con sola PA e 3 con entrambe; in nessuno di questi casi si è ottenuto un miglioramento clinico. In 25 pazienti il trattamento con farmaci immunomodulatori è stato eseguito prima trattamento del tumore, in 4 contemporaneamente al trattamento del tumore, in 14 dopo il trattamento del tumore, mentre in 3 pazienti non si è identificato alcun tumore. Tra i pazienti che sono stati trattati prima dell'identificazione del tumore due, hanno risposto al trattamento del tumore e non immunomodulante e due al trattamento immunomodulante e non a quello del tumore. Quattro pazienti sono stati trattati con farmaci immunomodulanti dopo il trattamento del tumore. In 3 la diagnosi del tumore è stata antecedente a quella della sindrome neurologica e non si avevano evidenze di ripresa di malattia neoplastica, in un caso si è invece si è avuta una risposta al trattamento immunomodulatore ma non a quello del tumore. In un solo caso il trattamento immunomodulante è avvenuto quasi contemporaneamente a quello del tumore per cui non è possibile essere certi che il miglioramento fosse imputabile al trattamento con

farmaci immunomodulatori o a quello del tumore. Complessivamente invece un miglioramento della sindrome neurologica a seguito del trattamento del tumore è stato ottenuto in 23/76 pazienti in cui la diagnosi di sindrome neurologica ha preceduto il riconoscimento della neoplasia associata.

OUTCOME

50/104 pazienti sono deceduti di questi 31 come conseguenza dell'evoluzione della malattia neurologica, 13 per progressione del tumore e 6 per altre complicanze. Di 5 pazienti non si hanno informazioni di follow up mentre nei restanti 49 si è osservato un grado di disabilità medio misurato con la scala di Rankin modificata (mRS) di 2 a un follow up medio di 26 mesi (range 6 mesi-7 anni).

CARATTERISTICHE DELL'ELP PLUS versus ELP PURA

ENCEFALITE LIMBICA PARANEOPLASTICA "PURA"

In questo gruppo sono stati inclusi 55 pazienti di età media pari a 57.8 anni (range 9-83) con mediana di 61 anni hanno presentato quadro di encefalite limbica pura. Si trattava di 18 femmine di età media pari a 57.4 anni (range 9-81) e di 37 maschi di età media pari a 57.9 anni (range 27-83).

CARATTERISTICHE CLINICHE

Crisi epilettiche: sono state riscontrate in 28 pazienti su 55. In 10 pazienti, gli attacchi avevano caratteristiche di crisi parziali complesse a origine temporale, in 8 pazienti le crisi erano di tipo parziale motorio. Crisi epilettiche generalizzate sono state invece riscontrate in 7 casi di cui 2 erano secondariamente generalizzate. In 2 casi il quadro era determinato da uno stato di male epilettico. Mentre per 3 casi era riportata la presenza di crisi epilettiche senza che fosse specificata la tipologia della crisi.

Compromissione delle funzioni cognitive: un deficit delle funzioni cognitive è stato riscontrato in 47 pazienti. Le alterazioni riguardavano un deficit della memoria presente in 40 pazienti e il deficit riguardava la capacità di apprendimento di nuovi eventi (deficit di memoria anterograda) con coinvolgimento parziale anche della memoria retrograda relativa agli eventi più recenti. Mentre un disorientamento spazio temporale è stato riscontrato in 25

pazienti. Più rare erano altre manifestazioni quali: sindrome disesecutiva (n=5), deficit di attenzione (n=3) e bradipsichismo (n=1).

Sintomi psichiatrici: sono state riscontrate in 28 casi. In quest'ambito venivano incluse alterazioni della personalità riportate in 15 pazienti, alterazioni del tono dell'umore sono sul versante depressivo in 6 pazienti, alterazioni dell'umore di tipo euforico sono state riscontrate invece in 3 pazienti. Quadri di ansia e agitazione sono invece stati identificati in 8 pazienti. Allucinazioni visive sono state descritte in solo paziente, mentre nessuno ha presentato quadro di franca psicosi.

Stato confusionale: la presenza di uno stato confusionale non altrimenti specificato, è stata riscontrata in 29 pazienti.

Tabella n.6 **Caratteristiche cliniche dei pazienti con ELP "pura"**

| | |
|------------------------------------|---------------------|
| Deficit di memoria a breve termine | 40 pazienti (72.7%) |
| Stato confusionale | 29 pazienti (52.7%) |
| Sintomi psichiatrici | 28 pazienti (50.9%) |
| Crisi epilettiche | 27 pazienti (49%) |

LATENZA DIAGNOSTICA

La latenza diagnostica delle forme pure era in media pari a 4.16 mesi (range 3 giorni-28 mesi) e con una mediana di 2 mesi

TUMORE

Una neoplasia è stata riscontrata in 51 pazienti. La diagnosi di tumore è stata eseguita in 40 pazienti dopo l'esordio della sindrome neurologica con un tempo medio di 3.8 mesi (range 0.5-23 mesi) mediana 2 mesi. In 11 pazienti la diagnosi di tumore era antecedente alla diagnosi di ELP con un tempo medio di 12.5 mesi (range 3-32 mesi) e con una mediana di 12 mesi. Il tumore più frequentemente diagnosticato era la neoplasia del polmone (n=29) il cui istotipo più frequente, era lo SCLC che è stato riscontrato in 23 pazienti. Il secondo tumore per frequenza è stato quello testicolare riscontrato in 9 pazienti seguito dal tumore della mammella (4 pazienti). Altre neoplasie riconosciute sono state: il tumore dell'ovaio (n=2), di cui un caso era un teratoma, neoplasie del tratto gastrointestinale (n=3), metastasi con tumore primitivo non noto (n=2), timoma (n=1) e neuroblastoma (n=1). La stadiazione di malattia

non era disponibile in 2 pazienti. Nei restanti 49 pazienti 26 avevano stadio limitato all'organo bersaglio, 14 avevano interessamento loco regionale dei linfonodi e 9 avevano metastasi a distanza.

ANTICORPI ANTI-NEURONE

Anticorpi anti neurone sono stati identificati in 47 casi. L'anticorpo più frequente è stato l'anti-Hu (n=24), seguito dall'anti-Ma2 (n=12). In due pazienti si sono riscontrati anticorpi anti-Ri, in due anti-Cv2, in due anti-amfifisina, in due anti-VGKC, mentre un paziente aveva anticorpi anti-NMDAR e un altro anti-VGCC. In un caso erano presenti nello stesso siero anticorpi anti-Hu e anti-amfifisina.

ESAME DEL LIQUOR

L'esame del liquor è stato eseguito in 45 pazienti e abbiamo riscontrato che 15 avevano un esame normale. In tutti gli esami effettuati è stato valutato il numero di cellule che in media era pari a 17.4 cell/mm³ (range 0-208) con una mediana di 4 cellule. Il contenuto proteico è stato esaminato in 41/45 esami liquorali e la concentrazione proteica media era pari a 66.6 mg/dl (range 13-240) con mediana di 49 mg/dl. La presenza di bande oligoclonali è stata analizzata in 22/55 casi ed erano presenti in 9/22. Il liquor è stato eseguito in media 2.34 mesi dopo l'esordio della sindrome neurologica (range 3 giorni-10 mesi) con una mediana di uno. In 36/45 pazienti l'esame è stato eseguito a meno di 3 mesi (range 3 giorni-3 mesi) dall'esordio clinico in questi pazienti in numero medio di cellule è risultato pari a 20 cellule/mm³ (range 0-208) con un numero mediano di 6.5, mentre il contenuto proteico è risultato pari a 66.6 mg/dl (range 13-240) con un mediana di 55 mg/dl.

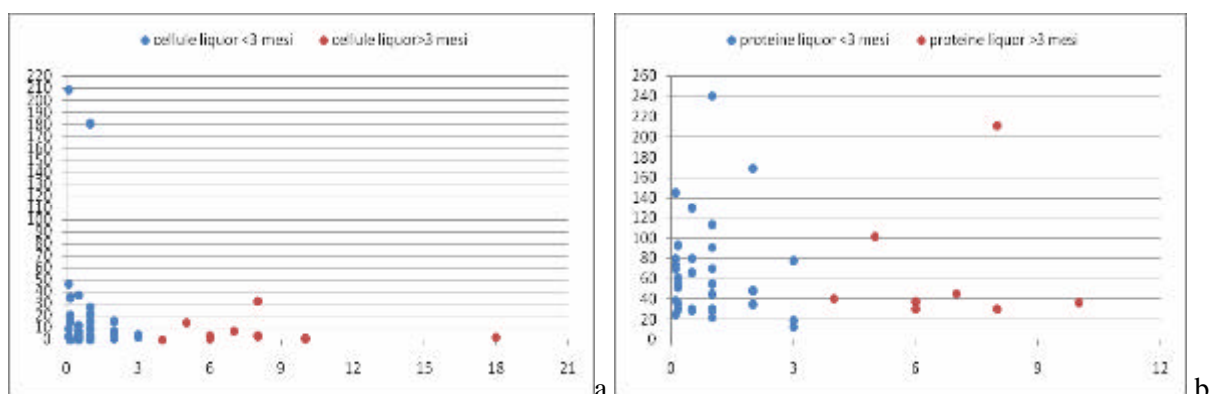


Figura n.15. ELP "pura". Distribuzione in funzione del tempo delle cellule (a) e delle proteine (b) sul liquor

RISONANZA MAGNETICA

È stata eseguita in tutti i pazienti con un tempo medio di latenza dall'esordio dei sintomi pari a 2.3 mesi (range 3 giorni-20 mesi) e con mediana di uno. La RNM encefalica era normale in 14 casi. In 28 invece, ha evidenziato alterazioni a livello ippocampale bilaterale nelle sequenze a TR lungo, e in 7 casi anche nelle sequenze T1 con presa di contrasto in 6 casi. Alterazioni ippocampali unilaterali, nelle sequenze a TR lungo, erano presenti in 12 pazienti e in 3 casi si sono avute alterazioni anche nelle sequenze Pesate in T1 mentre un'acquisizione di mezzo di contrasto si è avuta in 2 casi. Un paziente ha presentato anche alterazioni a carico dell'ipotalamo e uno anche a livello dei nuclei della base. Un paziente ha invece evidenziato alterazioni solo in sede frontale basale.

TERAPIA DELLA SINDROME NEUROLOGICA

21 pazienti sono stati trattati con farmaci immunomodulatori. In 19 pazienti sono stati utilizzati corticosteroidi in 15 casi da soli, mentre in 4 casi associati ad IVIg. 10 pazienti trattati con steroidi hanno presentato un miglioramento della sindrome neurologica di cui in due casi sono state associate anche IVIg. Un paziente è stato trattato con sole IVIg ed uno con sola PA senza ottenere miglioramento clinico. In 13 pazienti il trattamento ha preceduto quello del tumore in un paziente trattato non è invece stato riscontrato il tumore a un follow up di 1.5 anni. In questo gruppo una risposta si è ottenuta in 6 casi. Due pazienti che hanno risposto alla terapia immunomodulante avevano una neoplasia riconosciuta e trattata prima dell'esordio della SNP; in entrambi i casi non vi erano evidenze di ripresa di malattia oncologica al momento della diagnosi e del trattamento dell'ELP.

Un miglioramento della sindrome neurologica a seguito del trattamento del tumore è stato ottenuto in 12/41 pazienti in cui la diagnosi di sindrome neurologica è stata successiva al riscontro della neoplasia associata.

Tabella. n.7. ELP “pura”: pazienti trattati

| Terapia | Risposta alla terapia | Epoca di trattamento | Risposta alla terapia del tumore | Outcome | Causa del decesso |
|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------------------------|-----------|-------------------|
| Steroidi | No | Prima | No | Decesso | Tumore |
| Steroidi | No | Prima | No | Decesso | PNS |
| Steroidi | Si | Prima | No | Decesso | Altra |
| Steroidi | Si | Non tumore | Non tumore | RS3 (RS3) | |
| Steroidi + IVIg | Si | Prima | Si | RS2 (RS3) | |
| PA | No | Dopo | Si | Decesso | SNP |
| Steroidi | No | Dopo | Si | N/A | |
| Steroidi | Si | Prima | Si | N/A | |
| Steroidi | No | Prima | Si | N/A | |
| Steroidi + IVIg | Si | Dopo | No | RS2 (RS4) | |
| IVIg | No | Prima | N/A | Decesso | Altra |
| Steroidi | Si | Contemporanea | No | Decesso | Tumore |
| Steroidi + IVIg | No | Prima | No | RS3 | |
| Steroidi | No | Prima | N/A | Decesso | SNP |
| Steroidi | Si | Contemporanea | No | RS3 (RS4) | |
| Steroidi | Si | Prima | No | RS1 (RS2) | |
| Steroidi + IVIg | No | Prima | No | Decesso | SNP |
| Steroidi | No | Dopo | No | Decesso | Tumore |
| Steroidi | No | Dopo | N/A | Decesso | SNP |
| Steroidi | Si | Prima | N/A | RS2 (RS5) | |
| Steroidi | Si | Dopo | N/A | RS2 (RS3) | |

IVIg= immunoglobuline per endovena, PA= plasmferesi; Prima= trattamento immunomodulatore prima del trattamento oncologico; Dopo= trattamento immunomodulatore dopo il trattamento oncologico; Contemporaneo= trattamento oncologico quasi simultaneo al trattamento immunomodulatore; N/A= informazione non; disponibile. (RS)= Punteggio alla scala Rankin prima del trattamento immunomodulatore.

OUTCOME

23 pazienti sono deceduti e di questi 12 come conseguenza della sindrome neurologica, 7 per progressione della malattia oncologica, e 4 per altre cause. Il decesso per sindrome neurologica è avvenuto in un tempo medio di 6.9 mesi (range 2-22 mesi). I pazienti non deceduti hanno presentato un mRS medio di 2.5 a un follow up medio di 20 mesi (range 6-48). (range 2-22 mesi).

ENCEFALITE LIMBICA PARANEOPLASTICA “PLUS”

In 49 pazienti, di età media pari a 61.3 anni (range 21-84), è stata riscontrata la presenza di un quadro di encefalite limbica associata a segni e sintomi indicativi del coinvolgimento di aree extra limbiche (riportati in tabella 3). Si trattava di 20 femmine di età media pari a 60.4 anni (range 25-81 anni) e 29 maschi di età media pari a 62 anni (range 21-84 anni).

CARATTERISTICHE CLINICHE

Crisi epilettiche: sono state riscontrate in 18 pazienti su 49. In 7 pazienti le crisi avevano caratteristiche di crisi parziali complesse ad origine temporale, in 6 pazienti le crisi erano di tipo parziale motorio. Crisi epilettiche generalizzate sono state invece riscontrate in 8 di cui 4 erano secondariamente generalizzate. In un caso il quadro era determinato da uno stato di male epilettico.

Compromissione delle funzioni cognitive: erano presenti in 43 pazienti. Un deficit della memoria era presente in 40 pazienti il deficit riguardava la capacità di apprendimento di nuovi eventi (deficit di memoria anterograda) con coinvolgimento parziale anche della memoria retrograda relativa agli eventi più recenti. Mentre un disorientamento spazio temporale è stato riscontrato in 16 pazienti. Un quadro di bradispichismo è stato riconosciuto in 4 pazienti, mentre più rare sono risultate altre manifestazioni: deficit di attenzione (1 caso), sindrome disesecutiva (1 caso), acalculia (1 caso) ed afasia (2 casi).

Sintomi psichiatrici: erano presenti in 27/49 pazienti. Alterazioni della personalità erano evidenti in 15 pazienti. Alterazioni del tono dell'umore sono state riscontrate maggiormente sul versante depressivo con identificazione di un quadro di depressione in 12 pazienti. Quadri di ansia ed agitazione sono invece stati identificati in 10 pazienti. Un quadro di allucinazione visiva è stato riscontrato in 2 pazienti, mentre un paziente ha presentato quadro di franca psicosi.

Stato confusionale: Uno di stato confusionale non altrimenti specificato è stato riconosciuto in 28 pazienti.

Tabella n.8. **Caratteristiche cliniche dei pazienti con ELP “plus”**

| | |
|------------------------------------|---------------------|
| Deficit di memoria a breve termine | 40 pazienti (81.6%) |
| Stato confusionale | 28 pazienti (57.1%) |
| Sintomi psichiatrici | 27 pazienti (55.1%) |
| Crisi epilettiche | 18 pazienti (36.7%) |

LATENZA DIAGNOSTICA

La latenza diagnostica era in media pari a 4.2 mesi (range 3 giorni-30 mesi) con una mediana di 2 mesi.

TUMORE

Una neoplasia è stata riscontrata in 45 pazienti. In due pazienti però la storia di tumore datava più di 4 anni prima dello sviluppo della sindrome neurologica senza che si avesse recidiva di malattia al follow up. Si trattava in un caso di un paziente con anticorpi anti-Hu, storia di SCLC, identificato 10 anni prima l'esordio neurologico, e con un follow up clinico di un anno senza evidenziare recidiva di malattia ma con progressione della sindrome neurologica, il paziente è poi stato perso al follow up successivo. Il secondo caso era un paziente con storia di linfoma non Hodgkin, identificato 11 anni prima, con riscontro di anticorpi anti-Ma2 senza evidenza di altro tumore o progressione di malattia ad un follow up di 3 anni. La diagnosi di tumore è stata eseguita in 34 pazienti dopo il riconoscimento della sindrome paraneoplastica con un tempo medio di 4.47 mesi (range 0.5-18 mesi) mediana 3.5 mesi. In 9 pazienti la diagnosi di tumore era invece antecedente alla diagnosi della sindrome neurologica con un tempo medio di 5.1 mesi (range 1-15 mesi) e con una mediana di 3 mesi.

Il tumore più frequentemente riscontrato era il tumore del polmone riscontrato in 25 pazienti e l'istotipo più rappresentato era lo SCL che è stato riconosciuto in 18 pazienti. Altri tumori comprendevano: LH (n=3), testicolare (n=2), timoma (n=2), tratto urinario (n=3), tratto gastrointestinale (n=2), mammella (n=1), melanoma (n=1), metastasi con tumore primitivo non noto (n=1), tumore dell'ovaio (n=1), tumore della prostata (n=1), NHL (n=1).

La stadiazione di malattia non era disponibile in 2 pazienti. Nei restanti 43 pazienti si è riscontrato che: 17 pazienti avevano stadio limitato all'organo bersaglio, 16 avevano interessamento loco regionale dei linfonodi e 7 avevano metastasi a distanza. 3 pazienti avevano LH di stadio III in due casi e II in un caso secondo la stadiazione di Ann Arbor.

ANTICOPRI ANTI-NEURONE

Anticorpi anti-neurone sono stati riscontrati in 43 pazienti. Nella maggior parte dei casi erano anticorpi anti-Hu (n=24), seguiti da anticorpi anti-Ma2 (n=10). Altri anticorpi riscontrati sono stati: anti-Ri (n=2), anti-amfifisina (n=2). Si sono poi identificati singoli casi di: anti-NMDAR, anti-VGCC, anti-Tr, anti-CV2 associati ad anti-Ri ed anti-Hu ed anti-Hu associato ad anti-VGCC.

ESAME DEL LIQUOR

L'esame del liquor è stato eseguito in 38 pazienti. 10 pazienti avevano un esame liquorale normale. In tutti gli esami effettuati è stato valutato il numero di cellule che era in media pari a 12.5 cell/mm³ (range 0-123) con una mediana di 5 cellule. Il contenuto proteico è stato esaminato in 37/38 pazienti e la concentrazione proteica media del liquor era pari a 131.57 mg/dl (range 0-693) con mediana di 57 mg/dl. La presenza di bande oligoclonali è stata analizzata in 15 casi e sono risultate positive in 12.

Il liquor è stato eseguito mediamente 3.15 mesi dopo l'esordio della sindrome neurologica (range 0,15 giorni-18 mesi) con una mediana di 1.5 mese. In 29 pazienti è stato effettuato a meno di 3 mesi dall'esordio clinico (range 3 gg-3 mesi) in questi pazienti il numero medio di cellule è risultato pari a 13 cellule/mm³ (range 0-123) con un numero mediano di 4 cellule mentre il contenuto proteico è risultato pari a 121.2 mg/dl (range 10-693) con un mediana di 58 mg/dl.

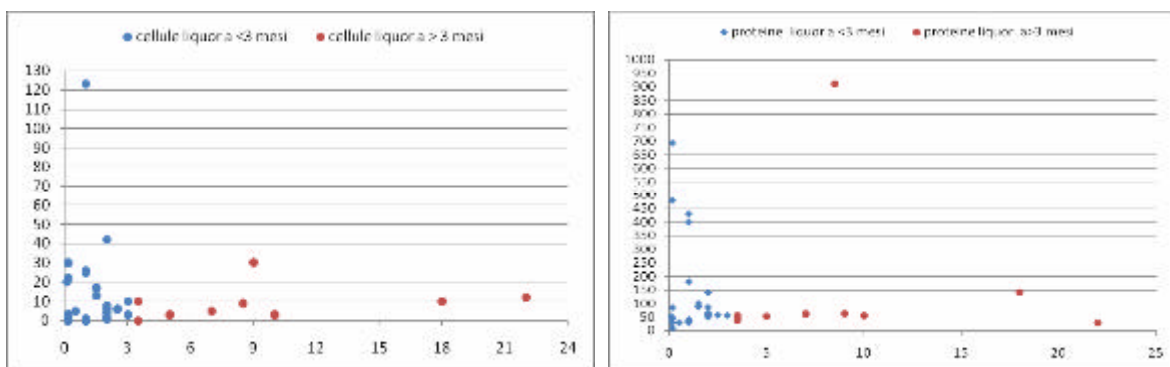


Figura n.16. ELP “plus”. Distribuzione in funzione del tempo delle cellule e delle proteine sul liquor

RNM ENCEFALICA

Dati inerenti la RNM encefalica non sono stati disponibili in 3 pazienti. Dei 46 pazienti di cui sui avevano informazioni, questa è stata eseguita a un tempo medio di 2.1 mesi (range 3 giorni-17 mesi) con una mediana di 1 mese. La RNM encefalica era normale in 13 casi, mentre erano evidenti nelle sequenze a TR lungo alterazioni a livello ippocampale bilaterale in 24 pazienti con riscontro di alterazioni anche nelle sequenze pesate in T1 in 6 pazienti e con presa di contrasto in 4 casi. Alterazioni unilaterali sono state riscontrate con le sequenze a TR lungo in 7 pazienti. Alterazioni anche in altre sedi erano presenti in 7 pazienti (2 polo temporale, 2 insula, 2 ipotalamo ed uno polo temporale, talamo, e porzione frontoparietale). Due pazienti non avevano alterazioni ippocampali: in un caso le alterazioni erano multiple con aspetto simil vasculitico ed in 1 caso si avevano alterazioni bi-occipitali e fronto-parietali.

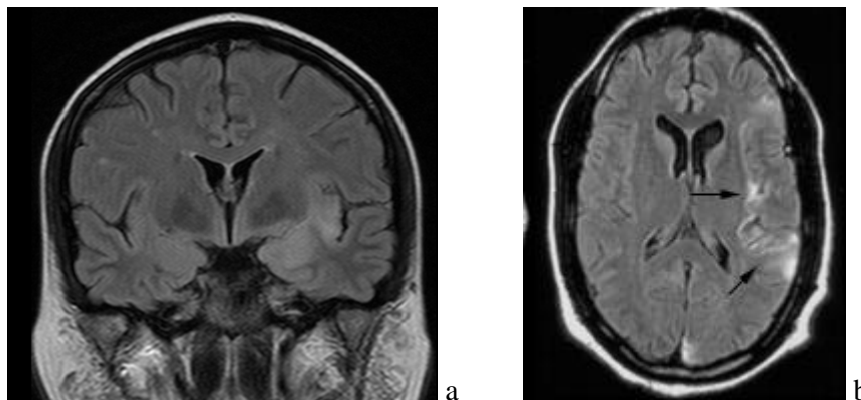


Figura n.17. **RNM encefaliche di due pazienti con ELP plus**. Immagine coronale (a) ed assiale (b) (flair) evidenziante alterazioni ippocampali bilaterali (a) e dell'insula destra (b).

TERAPIA DELLA SINDROME NEUROLOGICA

25 pazienti sono stati trattati con farmaci immunomodulatori. In 20 pazienti sono stati utilizzati corticosteroidi in 13 casi da soli, mentre in 3 casi associati ad IVIg ed 1 un caso a terapia immunosoppressiva (ciclofosfamide), un caso con PA e 2 casi con PA ed IVIg. Un paziente è stato trattato con sole IVIg, uno con sola PA e due con PA ed IVIg senza beneficio clinico. Sei pazienti trattati con steroidi presentano un miglioramento della sindrome neurologica di cui uno è stato trattato anche con IVIg e uno anche con IVIg e PA. Un paziente trattato con steroidi e immunosoppressori ha risposto al trattamento immunosoppressivo ma non a quello con steroidi. In 13 casi il trattamento immunomodulatorio ha preceduto il trattamento del tumore e in un caso non è stato riscontrato il tumore. Se consideriamo solo questo gruppo (superando possibile bias legato al trattamento del tumore) una risposta clinica

si è avuta in 4 casi. Un miglioramento della sindrome neurologica a seguito del trattamento del tumore è stata ottenuta in 10/34 pazienti in cui la diagnosi di sindrome neurologica è stata successiva all' esordio clinico.

Tabella n.9. ELP “plus” pazienti trattati

| Terapia | Risposta alla terapia | Epoca di trattamento | Risposta alla terapia del tumore | Outcome |
|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------------|-----------|
| Steroidi | Si | Prima | Si | Decesso |
| PA and IG | No | Dopo | No | Decesso |
| Steroidi | No | Contemporanea | No | Decesso |
| Steroidi | No | Dopo | N/A | Decesso |
| Steroidi | Si | Dopo | No | Decesso |
| Steroidi | No | Contemporanea | No | Decesso |
| Steroidi | No | Dopo | Si | Decesso |
| Steroidi + PA | No | Dopo | No | Decesso |
| PA | No | Prima | No | RS4 |
| Steroidi | No | Prima | No | Decesso |
| Steroidi | Si | Dopo | No | Decesso |
| Steroidi + IS | No/si | | Non tumore | RS4 (RS4) |
| Steroidi + IVIg | Si | Prima | Si | RS3 (RS5) |
| Steroidi + IVIg | No | Dopo | No | Decesso |
| Steroidi | No | Prima | N/A | RS2 |
| Steroidi + PA + IVIg | No | Prima | N/A | Decesso |
| Steroidi + IVIg | No | Prima | N/A | Decesso |
| Steroidi | No | Prima | No | Decesso |
| Steroidi | Si | Prima | N/A | RS3 (RS4) |
| Steroidi | No | Prima | No | RS2 |
| IVIg | No | Dopo | No | RS3 |
| PA + IVIg | No | Dopo | N/A | RS2 |
| PA + IVIg | No | Prima | Si | RS2 |
| Steroidi + PA + IVIg | Si | Prima | No | RS3 (RS5) |

IVIg= immunoglobuline per endovena, PA = plasmaferesi; IS immunosoppressione; Prima = trattamento immunomodulatore prima del trattamento oncologico; Dopo = trattamento immunomodulatore dopo il trattamento oncologico; Contemporaneo = trattamento oncologico quasi simultaneo al trattamento immunomodulatore; N/A = informazione non disponibile. (RS)= Punteggio alla scala Rankin prima del trattamento immunomodulatore

OUTCOME

27 pazienti sono deceduti di questi 19 come conseguenza della sindrome neurologica, 6 per progressione della malattia oncologica e 2 per altre cause. Nei pazienti deceduti per evoluzione della SNP il decesso è avvenuto dopo un tempo medio di 10 mesi (range 1.5-20). Nei pazienti vivi il RS medio era pari a 2.5 a un follow up medio di 30 mesi (range 6-84).

Tabella n.10 Confronto fra pazienti con ELP “pura” versus ELP “plus”

| | ELP pura | ELP plus | Significatività statistica |
|--|-------------------|----------------------|----------------------------|
| Sesso (rapporto M/F) | 37 M e 18 F (1:2) | 29 M e 20 F (1:1.45) | P=0.3948 |
| Età media (mediana) | 57.8 anni (61) | 61.3 anni (62) | P=0.2498 |
| Deficit di memoria (%) | 40 (72.7%) | 40 (81.6%) | P=0.4157 |
| Disorientamento S/T(%) | 25 (45.5%) | 16 (32.6%) | P=0.122 |
| Sindrome disesecutiva (%) | 5 (9%) | 1(2%) | P=0.1256 |
| Deficit di attenzione (%) | 3 (5.5%) | 1 (2%) | P=0.3685 |
| Bradipsichismo (%) | 1 (1.8%) | 4 (8.1%) | P=0.3253 |
| Alterazioni di Personalità (%) | 15 (27.3%) | 15 (30.6%) | P=0.8834 |
| Depressione (%) | 6 (10.9%) | 12 (25%) | P=0.046 |
| Agitazione (%) | 8 (14.5%) | 10 (20.4%) | P=0.5959 |
| Stato confusionale (%) | 29 (52.7%) | 28 (57.1%) | P=0.6531 |
| Crisi epilettiche (%) | 28 (50.9%) | 18 (36.7%) | P=0.1695 |
| Crisi focali (%) | 8 (14.5 %) | 6 (12.2%) | P=0.7807 |
| Crisi parziali complesse | 10 (18%) | 7 (14.3%) | P=0.6091 |
| Crisi generalizzate | 5 (9%) | 3 (6%) | P=0.7194 |
| Latenza diagnostica media | 4.16 mesi | 4.2 mesi | P=0.2132 |
| Intervallo fra esordio di ELP e diagnosi di tumore (media) | 3.8 mesi | 3.5 mesi | P=0.2213 |
| Tumore | 51 (92.7%) | 43 (87.7%) | P=0.5105 |
| SCLC | 23 | 18 | P=0.5982 |
| Testicolo | 9 | 2 | P= 0.0177 |
| Anticorpi anti neurone | 47 (85.5%) | 43 (87.7%) | P=0.9580 |
| Anti-Hu | 25 (53.2) | 23 (60.5%) | P=0.4408 |
| Anti-Ma2 | 12 (25.5%) | 10 (23.2%) | P=0.6632 |
| Esame del liquor normale | 15 (27.2%) | 10 (26.3%) | P=0.4901 |
| Coinvolgimento del sistema limbico alla RNM encefalica | 40 (72%) | 31(67.4%) | P=0.398 |
| Altre aree coinvolte | 3 (5.5%) | 9 (19.6%) | P=0.0660 |
| Pazienti trattati con terapia IM (%) | 21(38%) | 51% (25/49) | P=0.2363 |
| Risposta al trattamento nei pazienti non trattati per tumore (%) | 6/14 (42.8%) | 4/14 (28.6%) | P=0.6945 |
| Risposta al trattamento del tumore (%) | 12/41(29.3%) | 10/34 (29.4%) | P=1 |

IM= immunomodulante; Per le indagini statistiche sono stati usati i test Chi quadro, esatto di Fisher; t di Student e Wilcoxon

ENCEFALITE LIMBICA PLUS VERSUS ENCEFALOMIELITE

21/49 pazienti con ELP “plus” sono stati classificati come EMP secondo i criteri di Graus et al. [129]. Le caratteristiche di questo gruppo di pazienti sono state confrontate con quelle di 28 pazienti in cui il quadro di encefalite limbica veniva riportato in associazione ad altri sintomi clinici (ELP “plus”).

ENCEFALOMIELITE

Erano affetti da EMP 21 pazienti: 12 maschi e 9 femmine di età media pari a 66.3 anni (range 48-84). Il quadro clinico dell'encefalite limbica si è caratterizzato Per la presenza soprattutto di deficit della memoria (n=19) e stato confusionale (n=15) mentre meno frequenti erano i sintomi psichiatrici (n=11) e le crisi epilettiche (n=6). In associazione al quadro di encefalite limbica a definire la diagnosi di EMP hanno concorso la presenza di: degenerazione cerebellare paraneoplastica (n=11), neuronopatia sensitivo-motoria (n=6), encefalite del tronco (n=5), interessamento tratto corticospinale 3 casi e pseudoostruzione intestinale cronica 1 caso (tabella n.11). Una neoplasia è stata riscontrata in 19 pazienti. Il tumore è stato riscontrato nella maggior parte dei casi (n=16) dopo l'esordio della sindrome neurologica. In questo gruppo il tempo medio dall'esordio dei sintomi al riscontro della neoplasia è stato di 4.7 mesi (range 15 giorni-18 mesi). Il tipo di tumore più frequentemente riscontrato è stato lo SCLC (n=12) seguito dal LH (n=2) e da casi isolati di timoma, tumore del rene, vescica, NSCLC e metastasi con primitivo a sede non nota. Nei pazienti con EMP il liquor è stato esaminato in 14 casi ad un tempo medio dall'esordio di 4.5 mesi (range 1-8.5 mesi) ed è risultato normale in un solo caso. Valutando solo gli esami eseguiti a meno di tre mesi dall'esordio clinico si è osservato che il contenuto cellulare è risultato in media pari a 16.08 cell/ μ l (range 0-123) con valore mediano di 6. Il contenuto proteico è invece era in media pari a 71 mg/dl (range 40-180) con mediana di 58 mg/dl. La presenza di bande oligoclonali è stata ricercata in 6 casi/14 ed in tutti è risultata positiva. Uno studio di neuro immagine è stato ottenuto in 20 pazienti con EMP. L'esame era normale in 3 casi. L'alterazione più frequentemente riscontrata è stata quella a livello ippocampale nelle sequenze a TR lungo che in 4 casi è stata riscontrata anche nelle sequenze pesate in T1 e con evidenza in tutti e quattro i casi di presa di contrasto. Purtroppo non abbiamo sufficienti sul possibile coinvolgimento di aree extralimbiche nel gruppo con EMP, per descrivere tale aspetto. Anticorpi anti neurone sono stati riscontrati in 17/21 casi di EMP. Gli anticorpi più

frequentemente identificati sono stati gli anti-Hu (n=14). Altri anticorpi riconosciuti sono stati: anti- CV2 (n=1) e anti-amfifisina (n=1), anti-Hu associato ad anti-CV2 ed anti-Ri (n=1). 11 pazienti sono stati trattati con farmaci immunomodulatori di cui 8 con soli steroidi, uno con PA e steroidi, uno con sola PA ed uno con PA ed IVIg. Solo per due pazienti trattati con steroidi viene riportato un beneficio clinico. 4 pazienti su 16 con diagnosi di tumore successiva all'esordio dei sintomi neurologici hanno presentato una risposta alla terapia oncologica. 18 pazienti sono deceduti di questi 13 come conseguenza della sindrome neurologica ad un tempo medio di 9.7 mesi dall'esordio clinico. Tre pazienti sono deceduti come conseguenza del tumore e uno per altre cause. 4 pazienti erano vivi; di questi 3 avevano un mRS medio di 4 ad un follow up di 2 anni, mentre 1 paziente aveva mRS pari a 0 ad un follow up di 7 anni. Quest'ultimo era un paziente senza anticorpi con riscontro di linfoma di Hodgkin dopo l'esordio clinico della malattia neurologica che ha presentato miglioramento clinico dopo il trattamento del tumore che era in remissione completa all'ultimo follow up.

ENCEFALITE LIMBICA “PLUS”

In questo gruppo sono stati inclusi 28 soggetti, 18 maschi e 10 femmine, di età media pari a 57.64 anni (range 21-81). Il quadro clinico dell'Encefalite limbica era dominato dalla presenza di un deficit di memoria a breve termine (n=21) seguito in ordine di frequenza da i sintomi psichiatrici (n=16) e delle crisi epilettiche (n=12) e stato confusionale (n=13). Tra i sintomi associati si sono riscontrate: neuropatia periferica di tipo sensitivo-motorio (n=5), disautonomia (n=7), segni di coinvolgimento del sistema corticospinale (n=4), disordini del movimento (n=2), alterazioni del sonno (n=2), alterazione della termoregolazione (n=1), disturbi della conduzione neuromuscolare (n=2) e deficit corticali superiori 2 casi (tabella n.10). Una neoplasia è stata riscontrata in 24 pazienti. Nella maggior parte dei casi (n=20) il tumore è stato riscontrato dopo l'esordio della sindrome neurologica con un tempo medio di 4.65 mesi (range 15 giorni-15 mesi). Il tipo di tumore più frequentemente riscontrato aveva sede polmonare (n=12) con uguale numero di casi affetti da SCLC (n=6) e NSCLC (n=6). Due pazienti avevano un tumore a sede testicolare, 10 pazienti invece avevano ciascuno un tumore a sede diversa: LH, NHL, timoma, mammella, esofago, colon, melanoma, rene, prostata, ovaio). L'esame del liquor è stato eseguito in 24 casi ad un tempo medio di 2.4 mesi dall'esordio dei sintomi (range 3 giorni-18 mesi) ed in 9 pazienti è risultato normale per contenuto cellulare, proteico e/o presenza di bande oligoclonali. Valutando solo gli esami eseguiti a meno di tre mesi dall'esordio clinico si è osservato che il contenuto cellulare è

risultato in media pari a 9.66 cellule/ μ l (range 0-42) con una mediana di 3 cellule. Il contenuto proteico era in media pari a 137 mg/dl (range 0-699) nel primo gruppo con valore mediano di 53 , mentre nel secondo gruppo è stato pari in media a 71 mg/dl (range 40-180) con mediana di 58. La presenza di bande oligoclonali è stata ricercata in 9/24 esami nel primo gruppo ed ha dato esito positivo in 6. Uno studio di neuro immagine è stato ottenuto in 26 pazienti. L'esame era normale in 10 casi. Nei restanti casi si sono riscontrate a livello ippocampale alterazioni solo nelle sequenze a TR lungo. Anticorpi anti neurone erano presenti in 27pazienti. Gli anticorpi più frequentemente identificati in entrambi i gruppi sono stati gli anti-Hu (n=10), seguiti da anticorpi anti-Ma2 (n=10), anticorpi anti-Ri (n=2) e casi singoli di anticorpi anti-amfifisina, anticorpi anti-Tr, anti-Hu associato ad anti-VGCC e reattività atipica. 14 pazienti sono stati sottoposti a terapia immunomodulatoria. 5 sono stati trattati con soli steroidi di cui 2 casi hanno mostrato miglioramento clinico, 3 pazienti sono stati trattati con steroidi ed IVIg con risposta in un solo caso 2 pazienti sono stati trattati con steroidi, PA ed IVIg con risposta in un caso, 2 pazienti sono stati trattati con IVIg senza beneficio ed 1 paziente è stato trattato con steroidi ed immunosoppressori con beneficio clinico solo con immunosoppressori. 6/20 pazienti in cui il tumore è stato riscontrato dopo lo sviluppo della sindrome neurologica hanno tratto beneficio dal trattamento del tumore. 10 pazienti sono deceduti. 6 pazienti sono deceduti come conseguenza dell'evoluzione della sindrome neurologica a un intervallo medio di tempo dall'esordio clinico di 9.75 mesi (range 1.5-32 mesi), mentre 3 sono deceduti come conseguenza del tumore e 1 per altre cause, mentre 18 pazienti hanno presentato un mRS medio di 2.5 ad un follow up medio di 2.4 anni.

Tabella n.11 Quadri clinici associati all'Encefalite limbica nei pazienti con EMP e ELP "plus".

| Encefalomielite | ELP Plus |
|--------------------------------------|--|
| Degenerazione cerebellare (n=11) | Degenerazione cerebellare (n=4 i) |
| Neuronopatia (n=6) | Neuropatie neuropatie sensitivo-motorie (n=3), neuropatia sensitiva (n=1), poliradicolonevrite (n=1) |
| Encefalite del tronco (n=5) | Encefalite del tronco (n=4) |
| Ostruzione intestinale cronica (n=1) | Disautonomia pseudoostruzione intestinale cronica (n=4), ipotensione ortostatica (n=2), bradicardia (n=1) alterazione della salivazione(n=1) |
| Segni piramidali (n=3) | Segni piramidali (n=4) |
| | Disordini del movimento corea (n=1) mioclono(n=1) |
| | Alterazioni del sonno (n=2) |
| | Disturbi di placca NMT (n=1) LEMS (n=1) |
| | Ipotermia (n=1) |
| | Deficit corticali superiori afasia (n=2) acalculia (n=1) |

Tabella n.12. Confronto fra EMP ed EL “plus”

| | EMP | LE plus | significatività statistica |
|-------------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|
| Sesso | 9F:12M (1:1.3) | 10F:18M | P=0.6152 |
| Età media | 66.3 (range 48-84) | 57.64 (range 25-81) | P=0.0221 |
| CLINICA | | | |
| DEFICIT DI MEMORIA | 21/21 (100%) | 21/28 (75%) | p=0.6143 |
| STATO CONFUSIONALE | 13/21 (62%) | 15/28 (53.6%) | P=0.7710 |
| SINTOMI PSICHIATRICI | 11/21 (47.6%) | 16/28 (53.6%) | P=0.6831 |
| CRISI EPILETTICHE | 6/21 (28.6%) | 12/28(42.8%) | P=0.2089 |
| Tumore | 19 | 24 | P=0.6884 |
| Tipo di tumore | | | |
| SCLC | 12 | 6 | P=0.0111 |
| NSCLC | 1 | 6 | P=0.2144 |
| TESTICOLO | 0 | 2 | P=1 |
| Esame del liquor | 14 | 24 | P=0.2008 |
| Normale | 1 | 9 | |
| MRI | 20 | 26 | P=0.0203 |
| Normale | 3 | 10 | |
| Alterazioni Ippocampali | 17 | 15 | |
| T2 | 17 | 15 | |
| T1+ gad | 4 | 0 | |
| Anticorpo | 17/21 | 27/28 | |
| Anti-Hu | 15 | 11 | P=0.0024 |
| Anti-Ma2 | 0 | 10 | P=0.0272 |
| Anti-Cv2 | 2 | 0 | |
| Anti-Amfifisina | 1 | 1 | |
| Anti-Ri | 1 | 2 | |

Per le analisi statistiche sono stati usati i test Chi-quadro ed esatto di Fischer

CARATTERISTICHE DELL'ELP PER TIPO D'ANTICORPO

ELP ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-HU

Anticorpi anti-Hu sono stati riscontrati in 51/104 pazienti. I pazienti erano soggetti di età media di 65.2 anni (range 9-83) con mediana di 64 anni e di sesso prevalentemente maschile (33 maschi versus 18 femmine). La sindrome neurologica è stata diagnosticata in media dopo 4.4 mesi dopo l'esordio clinico (range 5 giorni-30 mesi) con una mediana di 2 mesi.

QUADRO CLINICO

Il quadro clinico si caratterizzava per l'esordio subacuto di una sindrome clinica definita da deficit della memoria a breve termine (n=40), stato confusionale (n=29), disorientamento S/T (n=21). Una sindrome disesecutiva è stata riscontrata in 3 casi, mentre un rallentamento ideomotorio in un solo caso. Una sindrome depressiva era presente in 9 casi ed uno stato di agitazione era presente in 7 casi. Alterazioni della personalità sono state riscontrate in 12 casi ed allucinazioni in 2 casi. 19 pazienti hanno presentato crisi epilettiche di cui 10 parziali complesse, 1 focali motoria e 6 generalizzate.

Sintomi indicativi di una localizzazione diversa da quella del sistema limbico sono stati riscontrati in 26 pazienti. In 7 pazienti si sono riscontrati segni e sintomi indicativi di interessamento cerebellare, in 5 pazienti una neuronopatia sensitiva, in 2 una neuropatia sensitivo motoria ed in uno di una poliradicolonevrite. 5 pazienti avevano segni di disautonomia con 4 casi di pseudoostruzione intestinale cronica e 2 di ipotensione ortostatica. 5 pazienti avevano segni d'interessamento del tronco encefalico. Un paziente aveva anche un quadro di LEMS e uno di NMT.

TUMORE

Un tumore è stato riscontrato in 46/51 pazienti. La sindrome neurologica è esordita prima del riscontro del tumore nella maggior parte dei pazienti (41/46). Il tempo intercorso fra l'esordio della sindrome neurologica e il riscontro del tumore è stato in media di 4.06 mesi (range 0.5-18 mesi) con una mediana di 2 mesi. In 5 pazienti il tumore era noto al momento dell'esordio della sindrome neurologica che si è manifestata a distanza di 9.4 mesi in media (range 1-15 mesi). Il tumore associato a sede polmonare in 40 pazienti ed in 34 casi si trattava di un microcitoma, 2 pazienti avevano un timoma associato, mentre negli altri 5 casi si sono riscontrati rispettivamente un tumore della prostata, uno dell'esofageo, un neuroblastoma ed una metastasi con primitivo a sede non nota. In 5 casi non è stata riconosciuta alcuna

neoplasia. Quattro di questi pazienti sono deceduti in seguito all'evoluzione della sindrome neurologica a meno di un anno dall'esordio clinico, mentre un paziente era ancora vivo ed ha mRS pari a 3 ad un follow up di 1.5 anni.

ESAME DEL LIQUOR

L'esame del liquor è stato eseguito in 37/51 pazienti a una distanza media dall'esordio dei sintomi di 2.69 mesi (range 3 giorni-22 mesi) con mediana di 1 mese. Un esame liquorale normale è stato diagnosticato in 9/37 pazienti. Il contenuto cellulare medio è stato pari a 13.46 cellule/mm³ (range 0-280) con mediana di 5, mentre il contenuto proteico disponibile per 34/37 esami effettuati era in media pari a 95.7 mg/dl (range 10-910) con mediana di 56 mg/dl. Informazioni sulle bande oligoclonali erano disponibili per 16 e erano presenti in 13 casi.

RISONANZA MAGNETICA

Informazioni inerenti la RNM encefalica erano disponibili in 49 pazienti. In questi pazienti la RMN è stata eseguita in media 2.21 mesi dall'esordio clinico (range 3 gg-8 mesi) con mediana di 1 mese ed è risultata normale in 11 pazienti. 31 pazienti avevano alterazioni a livello ippocampale nelle sequenze pesate in T2 e queste erano bilaterali in 26 casi ed unilaterali in 5 casi. Alterazioni ippocampali bilaterali si sono evidenziate anche nelle sequenze pesate in T1 in 8 pazienti ed in 5 casi si è evidenziata anche l'acquisizione di mezzo di contrasto. In tabella n.13 sono riportate le alterazioni ippocampali riscontrate.

Tabella n.13. Alterazioni alla RNM encefalica nei pazienti con ELP associata ad anticorpi anti-Hu

| Alterazioni ippocampali | Altre aree | Sequenze RNM |
|-------------------------|--|--------------|
| Unilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T1,T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T1,T2 e gad+ |
| Unilaterale sin | | T1,T2 e gad+ |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Unilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Unilaterale sin | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Unilaterale sin | polo temporale sin e gangli della base | T2 |
| Bilaterale | | T1,T2 e gad+ |
| Unilaterale sin | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T1,T2+ gad |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T1,T2+gad |
| Bilaterale | | T1,T2+gad |
| Unilaterale | | T2 |
| Unilaterale | | T2 |
| Unilaterale sin | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T1,T2 |
| Bilaterale | | T1,T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Unilaterale sin | | T2 |
| Bilaterale | Insula | T2 |
| Unilaterale sin | uncus, amigdala, talamo, fronto insulare | T2 |
| | Multiple | T2 |
| Bilaterale | | T2 |

TRATTAMENTO e OUTCOME

17 pazienti/51 sono stati trattati con terapia immunomodulatoria. 14 pazienti sono stati trattati con steroidi e di questi 3 pazienti anche con PA e/o IVIg. Due pazienti sono stati trattati con PA e IVIg ed un paziente con sola PA. Quattro pazienti, trattati con soli steroidi, hanno presentato un miglioramento della sindrome neurologica. Di questi 2 avevano avuto diagnosi di tumore prima della sindrome neurologica senza evidenza di progressione di malattia, uno era stato trattato contemporaneamente Per tumore ed nell'ultimo caso non si è riconosciuta la presenza di una neoplasia associata ad un follow up attuale di 1.5 anni. 7 dei pazienti con diagnosi di tumore successiva all'esordio della sindrome neurologica, hanno tratto beneficio dalla terapia del tumore. 29/51 pazienti sono deceduti. 7 pazienti sono deceduti come conseguenza della neoplasia, mentre 18 in seguito alla sindrome neurologica. Il tempo medio dall'esordio dei sintomi al decesso per sindrome neurologica era pari a 7.56 mesi (range 2-20). Il Rankin score mediano nei pazienti sopravvissuti a un follow up medio di 2.07 anni (range 6 mesi-4 anni) è stato pari a 3.

ELP ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-MA2

Su 104 pazienti 22 avevano anticorpi anti-Ma2 (21.2%). Si trattava di 16 soggetti maschi e 6 femmine di età media pari a 48.9 anni (range 24-69) con mediana di 47 anni. La sindrome neurologica è stata diagnosticata in questi pazienti in media a 5.9 mesi dall'esordio clinico (range 3 giorni-28 mesi) con una mediana di 4 mesi.

QUADRO CLINICO

Il quadro clinico si caratterizzava per la presenza di compromissione delle funzioni cognitive con deficit della memoria a breve termine presente in 16 pazienti (72.7%), disorientamento ST in 5 pazienti, bradipsichia in un paziente, acalculia 1 paziente. Uno stato confusionale era presente in 10 pazienti (45.5%). Sintomi psichiatrici si sono riscontrati in 10 pazienti (45.5%) e comprendevano alterazioni della personalità 7 pazienti e depressione (4 pazienti), agitazione era presente in 6 casi. 7 pazienti presentavano crisi epilettiche che in 6 casi erano di tipo focale motorio ed in un caso parziali complesse, 2 pazienti presentavano una secondaria generalizzazione delle crisi. In tutti i casi le crisi sono state controllate dalla terapia farmacologica tranne che in due casi che sono stati descritti anche in precedenza nel paragrafo 4.1. Altri sintomi clinici sono stati riportati in 10 pazienti (45.5%). 3 pazienti presentavano segni d'interessamento del tronco encefalico con quadro clinico caratterizzato da

coinvolgimento della motilità oculare in tutti e tre i casi. Due pazienti presentavano segni di atassia cerebellare e 2 pazienti segni piramidali. In due casi si è riscontrata la presenza di una neuropatia (in un caso di tipo sensitivo motorio ed caso solo sensitiva). Altre manifestazioni riscontrate in casi singoli comprendevano: disturbi del sonno, ipotermia, disautonomia (pseudo ostruzione intestinale cronica), ipotermia, mioclono e alterazioni del gusto.

TUMORE

Una neoplasia è stata riscontrata in 18/22 pazienti (81.8%). Il tumore è stato riscontrato dopo la comparsa della sindrome neurologica in 11/18 pazienti ad un tempo medio di 6.13 mesi (range 5 giorni-15 mesi) con mediana di 5 mesi. In 7 casi invece il tumore era noto al momento dell'esordio della sintomatologia clinica che si è manifestata a distanza di 7 mesi dalla diagnosi del tumore (range 1,5-18 mesi).

Il tumore più frequentemente riscontrato è stato il tumore del testicolo riscontrato in 10 casi. In 5/10 casi si trattava di tumore testicolare non seminomatoso, in 4 casi di un seminoma testicolare ed in un caso di un teratoma testicolare. 3 casi avevano un tumore del polmone non a piccole cellule mentre gli altri 5 casi avevano: un linfoma di tipo non Hodgkin, un tumore della mammella, un tumore esofageo, un melanoma ed un tumore renale. In 4 pazienti non è stato riscontrato alcun tumore.

ESAME DEL LIQUOR

L'esame del liquor è stato eseguito in 19/22 pazienti a una distanza media dall'esordio dei sintomi di 3.44 mesi (range 3 giorni-10 mesi) con mediana di 2 mese. Si è riscontrato un esame liquorale normale in 8/19 pazienti. Il contenuto cellulare medio è stato pari a 10.9 cellule/mm³ (range 0-46) con mediana di 3, mentre il contenuto proteico disponibile Per 17/19 esami effettuati era in media pari a 91.8 mg/dl (range 30-693) con mediana di 48 mg/dl. Informazioni sulle bande oligoclonali erano disponibili per 11 e sono risultate presenti in 7 casi.

RISONANZA MAGNETICA

Informazioni relative alla RNM encefalica erano disponibili in 21 pazienti. In questi pazienti la RMN è stata eseguita in media 3.69 mesi dall'esordio clinico (range 3 gg-20 mesi) con mediana di 2 mese ed è risultata normale in 5 pazienti. 16 pazienti avevano alterazioni a livello ippocampale nelle sequenze pesate in T2 e queste erano bilaterali in 12 casi ed unilaterali in 4 casi. Alterazioni ippocampali bilaterali si sono evidenziate anche nelle

sequenze pesate in T1, con acquisizione di mezzo di contrasto in 3 pazienti. In 6 casi si sono messe in evidenza alterazioni a sede diversa da quella dell'ippocampo (2 ipotalamiche, 3 temporo-polare e uno a livello dell'insula).

Tabella n.13. **Alterazioni riscontrate alla RNM encefalica in pazienti con ELP associata ad anticorpi anti-Ma2**

| Alterazioni ippocampali | Altre sedi | Sequenze di RNM |
|-------------------------|-----------------|-----------------|
| Bilaterale | Polo temporale | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T1,T2 e gad+ |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T1,T2 e gad+ |
| Bilaterale | | T2 |
| Unilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T1,T2 e gad+ |
| Unilaterale | | T2 |
| Unilaterale | temporo polare | T2 |
| Bilaterale | insula sinistra | T2 |
| Normale | | |
| Bilaterale | temporo polare | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Unilaterale | Ipotalamo | T2 |
| Bilaterale | Ipotalamo | T2 |
| Bilaterale | | T2 |

Gad+= gadolinio positive.

TRATTAMENTO OUTCOME

11/22 pazienti sono stati trattati con terapia immunomodulante. Cinque pazienti sono stati trattati solo con steroidi di cui uno ha mostrato miglioramento clinico con tale terapia. 3 pazienti sono stati trattati con steroidi e IVIg e 1 solo ha mostrato un miglioramento clinico. 2 sono stati trattati solo con IVIg ed uno con IVIg e PA senza miglioramento. 8/22 pazienti hanno tratto beneficio dalla terapia del tumore.

7/22 pazienti sono deceduti. 3 pazienti sono deceduti come conseguenza della neoplasia, mentre in 4 secondariamente alla sindrome neurologica. Il tempo medio dall'esordio dei sintomi al decesso per sindrome neurologica è stato pari a 21.5 mesi (range 6-36). Il Rankin score mediano nei pazienti sopravvissuti a un follow up medio di 2 anni (range 6 mesi-4 anni) era pari a 2.

ELP ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-RI

5 dei 104 avevano anticorpi anti-Ri. Uno di questi, un maschio di 60 anni con associato SCLC, aveva anticorpi anti-Ri associati ad anticorpi anti-CV2 ed anti-Hu ed è stato inserito nel gruppo di pazienti con Hu. I restanti 4 pazienti erano 2 maschi e 2 femmine di età media pari a 64 anni (range 56-81) la latenza diagnostica della malattia in questo gruppo è risultata essere in media pari a 7 mesi (range 3 giorni-17 mesi).

Un disturbo della memoria era presente in tutti e quattro i pazienti, mentre un disorientamento S/T in 2 pazienti ed uno stato confusionale in 2 pazienti. 1 paziente presentava una sindrome disesecutiva, mentre uno solo paziente ha presentato sintomi psichiatrici che si sono manifestati come un disturbo della personalità. In due pazienti si sono riscontrati sintomi indicativi dell'interessamento di aree al extra limbiche. In un caso si trattava di un quadro di pseudo-obstruzione intestinale cronica e in un altro caso d'ipopituitarismo, aprassia emiparesi ed alterazioni della motilità oculare.

Un tumore è stato riscontrato in tre pazienti e in tutti la diagnosi è stata successiva all'esordio della sindrome neurologica con un intervallo medio di 4,5 mesi (range 15 giorni 11 mesi). Si trattava di un tumore testicolare in un caso, in un caso di un carcinoma a origine bronchiale e di una metastasi con primitivo a sede non nota nel terzo caso. Il liquor è stato eseguito in tutti e quattro i casi ed era patologico in $\frac{3}{4}$ casi. Il contenuto cellulare medio era pari a 14.75 cellule/mm³ (range 2-32), mentre quello proteico era pari a 112.5 mg/dl (48-211); in tutti i casi è stata ricercata la presenza di bande oligoclonali con esito positivo solo in un caso.

La RNM encefalica è stata eseguita, in media dopo 1.4 mesi dall'esordio clinico, in tutti e quattro i pazienti con esito normale in un solo caso. 2 pazienti hanno presentato alterazioni solo ippocampali nelle sequenze pesate in T2, mentre un caso ha presentato alterazioni ippocampali bilaterali nelle sequenze pesate in T1 e T2 con presa di contrasto ed evidenza d'interessamento anche dell'ipotalamo.

Tutti i pazienti sono stati trattati con terapia immunomodulante. 2 pazienti hanno ricevuto solo terapia steroidea in seguito alla quale solo uno ha mostrato un iniziale beneficio clinico. Un paziente è stato trattato prima con steroidi senza beneficio clinico e quindi con immunosoppressori con beneficio. Un paziente trattato con PA e IVIg non ha presentato alcuna risposta clinica. Nessuno dei tre pazienti nei quali è stata riscontrata la presenza di una neoplasia ha risposto al trattamento del tumore. Due pazienti sono deceduti uno in seguito alla progressione della malattia oncologica l'altro per infezione intercorrente. Mentre due pazienti

sono vivi ed hanno un quadro neurologico stabile: uno con mRS1 a 2.5 anni di follow up ed uno in cui non è stata riscontrata la neoplasia ha un mRS4 a 7 anni di follow up.

ELP AD ANTICORPI ANTI-AMFIFISINA

Anticorpi anti-amfifisina sono stati identificati in 5 pazienti/104. Uno di questi, una donna di 74 anni con SCLC, aveva anche anticorpi anti-Hu ed è stato incluso nel gruppo con anticorpi anti-Hu. I restanti 4 pazienti erano 3 maschi ed 1 femmina di età media pari a 72 anni (range 65-77). La latenza diagnostica in questi pazienti è stata pari a 2.75 mesi (range 1-7). Un deficit della memoria a breve termine ed uno stato confusionale è risultato presente in tutti e 4 i pazienti, mentre un disorientamento ST è stato riscontrato solo in 2 pazienti. Alterazioni psichiatriche sono state riscontrate in 3 pazienti e comprendevano alterazioni della Personalità in tutti e tre i casi, depressione in un caso ed allucinazioni in un caso. Due pazienti hanno presentato crisi epilettiche uno di tipo parziale complesso e uno a carattere focale motorio. Inoltre in due pazienti si sono riconosciuti anche segni clinici di coinvolgimento di aree extralimbiche con atassia cerebellare in un caso e neuropatia sensitiva in un altro caso. Tutti e quattro i pazienti avevano una neoplasia associata. In un paziente era nota la presenza di una neoplasia vescicale che era stata diagnosticata 1 mese prima dell'esordio dei sintomi neurologici. In 3 pazienti è stata riscontrata una neoplasia dopo l'esordio neurologico con un intervallo di tempo medio di 8.5 mesi (range 1-23 mesi). Il tumore associato era: una neoplasia della mammella in un caso e del polmone negli altri due casi di cui uno era uno SCLC. L'esame del liquor è stato eseguito in tutti e quattro i pazienti con una latenza dall'esordio clinico di 2.3 mesi (range 5 giorni 7 mesi) ed era patologico in 2 casi. Il contenuto cellulare medio è stato pari a 10.5 cellule (range 0-35) mentre quello proteico pari a 89.5 mg/dl (range 40-180). In nessuno dei quattro casi è stata ricercata la presenza di bande oligoclonali. La RNM encefalica è stata eseguita in tutti e quattro i pazienti ad un intervallo medio dall'esordio di 2.25 mesi (range 15 giorni-7 mesi) ed era normale in un caso, mentre negli altri tre si sono evidenziate alterazioni esclusivamente nelle sequenze a TR lungo a livello ippocampale bilaterale. Due pazienti sono stati trattati con steroidi senza avere beneficio clinico. Nessuno ha risposto alla terapia del tumore. Tre pazienti sono deceduti come conseguenza dell'evoluzione della sindrome neurologica con un tempo medio di 10.8 mesi (range 1.5-22). Un paziente è vivo con un mRS di 4 ad 1 anno di follow up.

ELP ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-CV2

Tre pazienti su 104 avevano anticorpi anti CV2 (un paziente con anche anticorpi anti-Ri ed Hu è stato incluso nel gruppo degli Hu). Si trattava di 2 femmine ed 1 maschio di età media pari a 58.7 anni (range 44-68) con latenza diagnostica per la sindrome neurologica di 4.2 mesi (range 15 giorni-8 mesi). Un paziente si presentava con deficit della memoria a breve termine, stato confusionale e sindrome depressiva, un secondo paziente presentava disorientamento S/T agitazione, confusione ed alterazione della personalità ed un'altro paziente disorientamento S/T, crisi epilettiche generalizzate e bradipsichia associati a segni cerebellari e piramidali. Una neoplasia correlata è stata identificata in due casi dopo l'esordio della sindrome neurologica. Si trattava in un caso di uno SCLC riscontrato dopo 7 mesi dall'esordio clinico e di un timoma riscontrato dopo 15 giorni dall'esordio clinico. In un caso si trattava di un tumore della mammella identificato due anni prima la SNP senza evidenza di recidiva o progressione della malattia oncologica a un follow up di 2 anni. L'esame del liquor è stato eseguito solo in due casi a 15 giorni dall'inizio della malattia neurologica. In un caso si è riscontrato un aumento del contenuto proteico 55 mg/dl senza incremento del numero di cellule e con presenza di tenui bande oligoclonali nel siero e nel liquor (mirror pattern), mentre nell'altro caso si è evidenziato un aumento delle cellule ($15/\text{mm}^3$) senza modificazioni del contenuto proteico, in questo caso non sono state ricercate le bande oligoclonali. La RNM encefalica è stata eseguita in tutti e tre i casi a distanza media pari a 32.4 mesi dall'esordio clinico (range 15 giorni-4 mesi). In due casi si sono evidenziate alterazioni ippocampali nelle sequenze a TR lungo con distribuzione unilaterale in un caso e bilaterale nell'altro, mentre in un caso l'esame era normale. Due pazienti sono stati trattati con steroidi e in un caso è stato riportato un miglioramento clinico questa paziente ha un RS2 a un follow up di 3 anni. Gli altri due pazienti sono deceduti come conseguenza della sindrome neurologica rispettivamente a 1 e 20 mesi dopo l'esordio clinico.

ELP ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-TR

Su 104 pazienti anticorpi anti-Tr sono stati riscontrati in un unico caso. Si trattava di un maschio di 45 anni che nel novembre del 2001 iniziava a presentare stato confusionale, disorientamento spazio temporale ed agitazione associata ad un disturbo del sonno caratterizzato da insonnia completa. Dagli esami ematochimici non emergeva nulla di rilevante, fatta eccezione che per una sodiemia lievemente ridotta (130 mmol/L). L'esame del

liquor eseguito a circa 1 mese dall' esordio clinico è risultato nella norma così come lo studio di RNM encefalica. A due mesi dall'esordio clinico è stato diagnosticato un linfoma di Hodgkin stadio IIIB che è stato trattato con chemioterapia (schema ABVD). Il trattamento del tumore ha portato a un miglioramento clinico significativo: il paziente è passato da un mRS di 3 al momento della diagnosi clinica ad un mRS1 alla completa remissione del tumore ottenuta un anno dopo. A 7 anni di follow up il mRS si mantiene ad 1 ed il paziente non ha presentato recidive di malattia.

ELP ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-VGKC

Solo in 2 pazienti sui 104 esaminati avevano anticorpi anti-VGKC. Le caratteristiche di questi due pazienti sono state recentemente pubblicate da uno dei nostri collaboratori [69]. In un caso si trattava di una donna di 60 anni che veniva ricoverata per la comparsa di vomito ricorrente e calo ponderale. All'ingresso presentava iponatriemia severa (118 mmol/l) ed alterazioni fluttuanti dello stato di coscienza. Corretta l'iponatriemia dovuta a SIADH) la paziente iniziava a presentare crisi epilettiche subentranti caratterizzate da clonie all'emisoma di sinistra con versione del capo. Le crisi venivano controllate dalla terapia antiepilettica. La RNM encefalica ed un esame del liquor risultarono normali. Durante la degenza si diagnosticava una massa mediastinica che la biopsia transbronchiale rivelò essere uno SCLC. La paziente morì 3 mesi dopo Per progressione della malattia oncologica. Il secondo caso era un uomo di 47 anni che veniva ricoverato Per la comparsa di deficit della memoria sia anterograda che retrograda, stato confusionale, confabulazione, disorientamento S/T, modificazione della Personalità con agitazione e disinibizione. Presentava inoltre delle crisi parziali complesse con evidenza EEG di punte in regione temporale bilaterale. Gli esami ematochimici erano nella norma e la sodiemia era pari a 134 mmol/l. L'esame del liquor eseguito a 5 giorni dall'esordio dei sintomi ha dimostrato la presenza di 20 globuli bianchi/mm³ e 61 mg/dl di proteine, mentre non è stata evidenziata la presenza di bande oligoclonali. Alla RNM encefalica si è evidenziata la presenza di alterazioni di segnale ippocampali bilaterali nelle sequenze a TR lungo. Due mesi dopo l'esordio è stata riscontrata la presenza di uno SCLC. Il paziente è stato trattato con chemioterapia e steroidi con miglioramento parziale della sintomatologia clinica. 5 mesi dopo presentò una recidiva della sintomatologia clinica e del tumore. Il paziente fu trattato con steroidi con miglioramento clinico parziale, ma morì come conseguenza della progressione del tumore 5 mesi dopo.

ELP ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-VGCC

Anticorpi anti-VGCC sono stati riscontrati in due pazienti. In un caso si trattava di un paziente con encefalite limbica associata a LEMS ed erano presenti anche anticorpi anti-Hu ed il caso è stato compreso nel gruppo con anti-Hu (gli anticorpi anti-VGCC sono stati legati alla LEMS). Nel secondo caso si trattava di una donna di 65 anni che si presentava alla osservazione con una storia clinica iniziata un mese prima circa con disturbi della memoria, stato confusionale, agitazione e crisi epilettiche focali motorie. Gli esami ematochimici di routine erano nella norma. L'esame liquorale evidenziava la presenza di 180 cellule/mm³ e 240 mg/dl di proteine, mentre non erano presenti bande oligoclonali. La RNM encefalica dimostrava la presenza di alterazioni ippocampali bilaterali nelle sequenze a TR lungo. A 4 mesi di distanza dall'esordio clinico è stata diagnosticata la presenza di uno SCLC. La paziente è stata trattata con steroidi senza miglioramento clinico e non ha risposto alla terapia oncologica. A un follow up di 6 mesi aveva un mRS2 con le crisi epilettiche che vengono controllate dalla terapia farmacologica.

ELP ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-NMDAR

Anticorpi anti-NMDAR sono stati riscontrati in 2 casi. In un caso si trattava di una donna di 25 anni veniva ricoverata Per comparsa di delirio ed allucinazioni, nei giorni precedenti il ricovero aveva inoltre lamentato febbre, cefalea, affaticabilità. All'ingresso si riscontravano deficit della memoria a breve termine, stato confusionale, confabulazione ed alterazione della Personalità con agitazione, disinibizione ed allucinazioni. Si osservò inoltre la presenza di ipersalivazione bradicardia (40 bpm). In seguito la paziente sviluppò uno stato di male epilettico che richiese il ricovero in terapia intensiva. Gli esami ematochimici di routine erano nella norma. L'esame del liquor, eseguito 3 giorni dopo l'esordio clinico, era anch'esso normale. Una RNM encefalica eseguita dopo cinque giorni dall'esordio clinico ha dimostrato la presenza di alterazioni nelle sequenze a TR lungo a livello bi occipitale e fronto-parietale. La paziente è stata trattata con steroidi e Ig vena senza significativo miglioramento clinico. Durante la degenza è stata riscontrata la presenza di un teratoma dell'ovaio che è stato asportato chirurgicamente con successivo miglioramento clinico (RS da 5 a 3) ed una RNM encefalica ripetuta a distanza di 2 mesi è risultata nella norma.

Il secondo caso era una donna di 35 anni che veniva ricoverata Per la comparsa di una crisi tonico-clonica generalizzata. In anamnesi veniva riportata nelle due settimane precedenti la

comparsa di disturbi della memoria con impossibilità a ricordare gli eventi recenti. Alla risoluzione della crisi epilettica la paziente appariva disorientata nello spazio e nel tempo, Perseverante, rallentata e con comportamento bizzarro. Gli esami ematochimici di routine erano nella norma. L'esame del liquor dimostrò la presenza di 9 cellule/mm³ e 70 mg/dl di proteine, in assenza di bande oligoclonali. La RNM encefalica era invece nella norma. Un mese dopo l'esordio clinico fu riscontrata la presenza di un teratoma immaturo dell'ovaio che fu asportato chirurgicamente ed è quindi stata intrapresa chemioterapia con (belomicina, etoposide e cisplatino). La paziente fu inoltre trattata con steroidi in boli seguita da terapia con prednisone 1 mg/kg/die e IVIg. A quattro mesi dal trattamento chirurgico la sintomatologia clinica della paziente era completamente regredita.

ELP NON ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-NEURONE

In 13 pazienti non si sono riscontrati anticorpi anti-neurone. Si trattava di 10 maschi e tre femmine di età media pari a 66.8 anni (range 59-84) con mediana a 66 anni. La latenza diagnostica in questo gruppo di pazienti è stata pari a 2 mesi (range 3 giorni-6 mesi).

QUADRO CLINICO

Il quadro clinico in questi pazienti si caratterizzava Per un deficit della memoria presente in 10 casi, disorientamento S/T presente in 5 casi, sindrome disesecutiva presente in 2 casi, deficit di attenzione presente in 3 casi rallentamento ideomotorio presente in 1 caso. Una sindrome depressiva e alterazioni della personalità sono state riscontrate in 3 casi, mentre in 2 casi era presente un quadro di agitazione. Uno stato confusionale è stato riscontrato in 6 casi. Crisi epilettiche si sono riconosciute in 7 pazienti: in 3 casi si trattava di crisi focali motorie, in un caso di crisi parziali complesse con secondaria generalizzazione, in un caso di una crisi generalizzata, in un caso di uno stato di male epilettico ed in un caso il tipo di crisi non veniva specificato. In 5 casi si riscontravano segni clinici di interessamento extra-limbico. In 4 casi erano presente una atassia cerebellare, in 2 casi segni di interessamento piramidale, in un caso interessamento del tronco encefalico ed in un caso era presente una corea.

TUMORE

Un tumore è stato riscontrato in tutti i pazienti. In 5 pazienti la neoplasia era nota al momento della diagnosi e l'intervallo medio di tempo dalla diagnosi del tumore all'esordio dei sintomi è stato di 9.4 mesi (range 3-32), mentre in 8 casi il riscontro del tumore è stato successivo

all'esordio dei sintomi con un intervallo medio di tempo di 2.9 mesi (range 0,5-6) e mediano di 2.25. In 4 casi la neoplasia aveva localizzazione polmonare (SCLC in 2 casi); in 3 casi al tratto gastrointestinale (1 del colon e 2 dello stomaco), in due casi si trattava di un LH , in un caso di tumore renale, in un caso di tumore della mammella, in uno dell'ovaio ed in un altro caso di una metastasi con primitivo a sede non definita.

ESAME DEL LIQUOR

L'esame del liquor è stato eseguito in 10 pazienti ad un intervallo medio dall'esordio dei sintomi di 1.6 mesi (range 3 giorni-6 mesi) ed è risultato normale in 3 casi. Il contenuto cellulare medio era pari a 18.1 cellule/mm³ (range 0-123) con valore mediano di 4.5, mentre il contenuto proteico era pari a 55.7 mg/dl (range 25-91) con mediana a 51.1. La ricerca delle bande oligoclonali è stata eseguita in 3 casi e non è risultata positiva in nessun caso.

RISONANZA MAGNETICA

La RNM encefalica è stata eseguita in tutti i pazienti a un intervallo di tempo medio dall'esordio dei sintomi pari a 1.12 mesi (range 5 giorni-3.5 mesi) ed era normale in 4 casi. In 7 casi si è mostrata una alterazione nelle sequenze a TR lungo a livello ippocampale bilaterale, con in un caso anche alterazione T1 ed acquisizione di mezzo di contrasto. In un caso si è evidenziata un'alterazione ippocampale unilaterale e in un caso solo a livello frontale bilaterale. 4 pazienti sono stati trattati con steroidi e uno solo ha mostrato un qualche miglioramento della sindrome clinica.

Tabella n. 13. **Alterazioni riscontrate alla RNM encefalica in pazienti con ELP senza anticorpi**

| Alterazioni ippocampali | altre sedi | Sequenze di RNM |
|--------------------------------|-------------------|------------------------|
| | Frontale | T2 |
| Unilaterale Sin | | T1,T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T2 |
| Bilaterale | | T1, T2+ Gad+ |

Gad+= acquisizione di mezzo di contrasto (gadolinio)

TRATTAMENTO ED OUTCOME

Un paziente è stato trattato con IVIg senza miglioramento della sindrome neurologica. 4 pazienti hanno dimostrato di avere una risposta al trattamento del tumore. 4 pazienti sono deceduti come conseguenza della sindrome neurologica ad un intervallo di tempo medio di 4.25 mesi (range 2-7) due pazienti sono deceduti come conseguenza del tumore, uno è deceduto per altre cause.

Sei pazienti hanno presentato RS medio di 2.2 ad un follow up medio di 2.78 anni (range 10 mesi-7 anni).

Tabella 16. **Caratteristiche delle ELP Per tipo di anticorpo**

| | Anti-HU | Anti-Ma2 | Anti-Ri | Anti-Amf | Anti-CV2 | Anti-Tr | Anti VGKC | Anti-VGCC | Anti-NMDAR | No Ab |
|---|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------|------------------|-------------------|--------------|
| N.Casi | 51 (49%) | 22 (21%) | 4 (3.8%) | 4 (3.8%) | 3 (2.8%) | 1 (0.9%) | 2(1.9%) | 1 (0.9%) | 2 (1.9%) | 13 (12.5%) |
| Sesso (M/F) | 33/18 | 16/6 | 2/2 | 3/1 | 1/2 | 1M | 1/1 | 1F | 2F | 10/3 |
| Età Media | 65.2 | 48.9 | 64 | 72 | 58.7 | 45 | 53.5 | 65 | 30 | 66.8 |
| Latenza Diagnostica Media (Mesi) | 4.4 | 5.9 | 7 | 2.75 | 4.2 | 1.5 | 1.5 | 1 | 2 | 2 |
| Deficit di memoria | 40 | 16 | 4 | 4 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 10 |
| Disorientamento S/T | 21 | 5 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 5 |
| Sindrome Disesecutiva | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Stato Confusionale | 29 | 10 | 2 | 4 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 6 |
| Alterazione Della Personalità | 12 | 7 | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 3 |
| Depressione | 9 | 4 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Crisi Epiletiche | 21 | 7 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 7 |
| Altri Sintomi | 26 | 10 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 5 |
| Tumore | 46 | 18 | 3 | 4 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 13 |
| SCLC | 34 | | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 |
| Testicolo | 0 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mammella | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Altri Tumori | 12 | 8 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 10 |
| Liquor Normale (Numero Esami) | 9 (37) | 8(19) | 1(4) | 2(4) | 0 (2) | 1 | 1(2) | 0(1) | 1(2) | 3(10) |
| MRI Normale (Numero Esami) | 11 (49) | 5 (21) | 1 (4) | 1 (4) | 1(3) | 1 | 1(2) | 0(1) | 1(2) | 4(13) |
| Terapia IM (Risposta) | 17 (4) | 11 (2) | 4 (2) | 2(0) | 2 (1) | 0 | 1(1) | 1(0) | 2(1) | 5 (1) |
| Risposta al Trattamento del tumore | 7 | 8 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 4 |
| Decesso | 29 | 7 | 2 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 7 |
| Per SNP | 18 | 4 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Per tumore | 7 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Per altra causa | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| RS Medio all'ultimo follow up | 3 | 2 | 2,5 | 4 | 4 | 1 | | 2 | 1,5 | 2.2 |

anti amf= anti-amfifisina; no ab= anticorpi assenti;S/T= spazio/temporale

ELP ASSOCIATA AD UNA RETTIVITÀ ANTICORPALE ATIPICA: CARATTERIZZAZIONE DI UN NUOVO ANTICORPO

CASO CLINICO

Una donna di 61 anni, fino a quel momento in buona salute, veniva condotta al Pronto Soccorso nell'Aprile 2006 in quanto da alcuni giorni i familiari avevano notato che la paziente tendeva a ripetere continuamente le stesse domande, inoltre veniva riferito che dal marzo us la paziente lamentava di non percepire il sapore dei cibi. All'ingresso la paziente si presentava disorientata nello spazio e nel tempo, con deficit della memoria a breve termine e con attività ideomotoria rallentata; per il resto l'esame neurologico era nella norma. In anamnesi si segnalava un intervento di asportazione di melanoma nel 2000 con follow up negativo per ripresa di malattia. Veniva eseguita all'ingresso una TAC cerebrale che evidenziava segni di sofferenza vascolare ischemica cronica ed un EEG che dimostrava la presenza di theta aguzzo intermittente sulle regioni temporali di sinistra. Gli esami ematochimici di routine erano nella norma tranne che per la presenza d'iperglicemia Per cui si diagnosticava un diabete mellito. L'esame del liquor eseguito dopo 15 giorni dall'esordio dei sintomi ha evidenziato la presenza di 26 leucociti/mm³ e 430 mg/dl di proteine, mentre negativa era la ricerca di virus e batteri. Una successiva RNM encefalica con contrasto eseguita a 20 giorni dall'esordio clinico è risultata nella norma. La ricerca degli anticorpi anti-neurone "classici" ed una TAC total body per la ricerca di una eventuale neoplasia risultarono negativi. S'intraprese quindi una terapia empirica a base di ceftriaxone ed acyclovir associato a terapia corticosteroidica con miglioramento delle funzioni cognitive tranne che per il persistere del deficit di memoria a breve termine. A giugno dello stesso anno la paziente presentava una ricaduta clinica con comparsa di agitazione, malessere, irrequietezza e insonnia per cui veniva trattata con terapia steroidea (metilprednisone 1gr ev per 5 giorni) con iniziale beneficio clinico persistendo solo il disturbo mnesico. A settembre dello stesso anno presentò un'altra ricaduta con stato confusionale e disorientamento spazio-temporale. Venne quindi ripetuta una nuova RNM encefalica che evidenziò la presenza di una lieve iperintensità di segnale a livello ippocampale bilaterale. Gli esami ematochimici erano nella norma tranne che per la presenza d'iperglicemia. E l'esecuzione di una PET total body per la ricerca di una neoplasia occulta portò nel dicembre 2006 all'identificazione di una sospetta neoplasia mammaria. La paziente fu quindi sottoposta a trattamento chirurgico (mastectomia e

svuotamento linfonodale ascellare) della sospetta lesione mammaria che risultò essere un carcinoma duttale infiltrante (T1, N3, M0). In seguito le condizioni cliniche della paziente peggiorarono per comparsa di afasia, deficit di forza ai quattro arti, stato soporoso ed insufficienza respiratoria. Un esame liquorale ripetuto a questo punto era nella norma. La paziente fu trattata con PA, IVIg e terapia steroidea con iniziale e graduale miglioramento delle condizioni cliniche. All'ultimo Follow up nel settembre 2008 era in grado di svolgere le comuni attività della vita quotidiana persistendo solo un lieve deficit della memoria recente. Dopo la seconda ricaduta, il siero della paziente è stato nuovamente analizzato con metodica immunohistochimica modificata è stata riconosciuta una reattività anticorpale atipica.

ANALISI DELLA REATTIVITÀ ANTICORPALE ATIPICA

Il siero della paziente è stato testato con metodica immunohistochimica modificata ed è stata riconosciuta la presenza di una reattività anticorpale atipica. Infatti, il siero della paziente colorava lo strato molecolare dell'ippocampo in maniera omogenea, inoltre a livello cerebellare si riconosceva una lieve reattività diffusa a livello dello strato molecolare con risparmio delle cellule neuronali. Il tessuto utilizzato per identificare tale reattività era ottenuto da encefalo di ratto fissato in paraformaldeide (PFA) al 4% e quindi congelato (figura n.18), se l'encefalo di ratto veniva invece congelato e quindi post-fissato con PFA al 4% per 20 minuti la reattività risultava meno definita ed di più difficile identificazione (figura n.19).

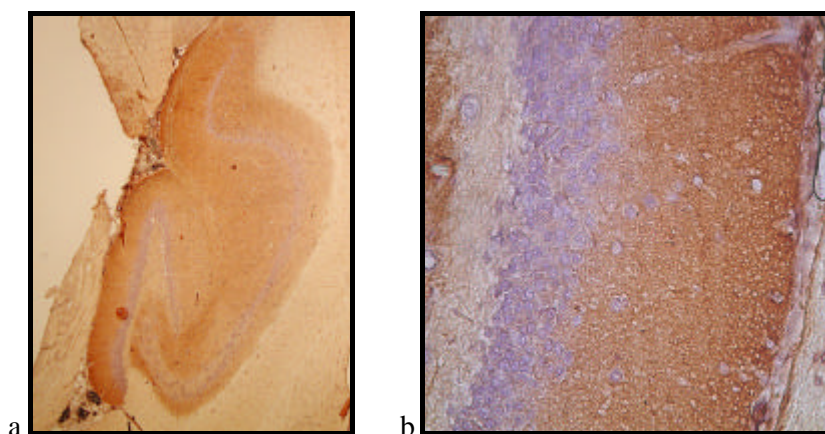


Figura n.18. **Reattività anticorpale atipica.** Immunohistochemica su tessuto prefissato in PFA. In a (200x) si evidenzia come il siero del paziente determini una colorazione diffusa dello strato molecolare dell'ippocampo e giro dentato. in b (400x) si evidenzia come vengano risparmiati i corpi cellulari mentre si abbia una colorazione diffusa del neuropilo.

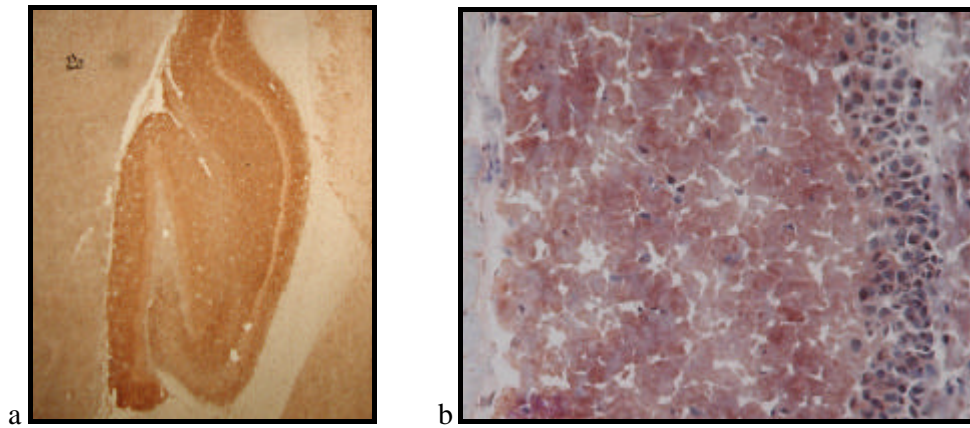


figura n 19. **Reattività anticorpale atipica.** immunoistochimica su tessuto congelato e post fissato. in a (200x) sezione di ippocampo e giro dentato si nota la colorazione diffusa che tuttavia appare meno definita che nell'immagine precedente. in b (400x) il tessuto mostra più artefatti che nel precedente preparato.

IMMUNOCITOCHIMICA

In seguito è stata analizzata la reattività anticorpale su colture di cellule ippocampali allo scopo di verificare se il siero della paziente reagisse con antigeni di superficie neuronali con cui si è evidenziato che tale il siero determinava una colorazione punteggiata a livello del corpo cellulare e delle proiezioni dendritiche e dell'assone.

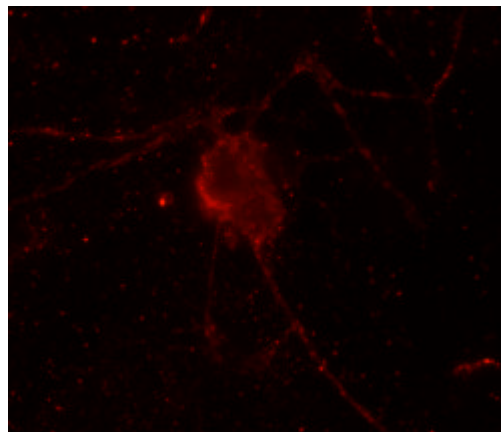


Figura n. 20. **Immunofluorescenza su colture ippocampali** (800x) si evidenzia come il siero del paziente determini una colorazione punteggiata a livello del soma cellulare e delle terminazioni nervose.

Per valutare se la reattività determinata dal siero del paziente fosse analoga a quella determinata dagli anticorpi anti-VGKC è stata eseguita una doppia immunocolorazione con il siero del paziente e quello di un paziente con anticorpi anti VGKC e non si è dimostrata alcuna co-localizzazione (figura n.21)

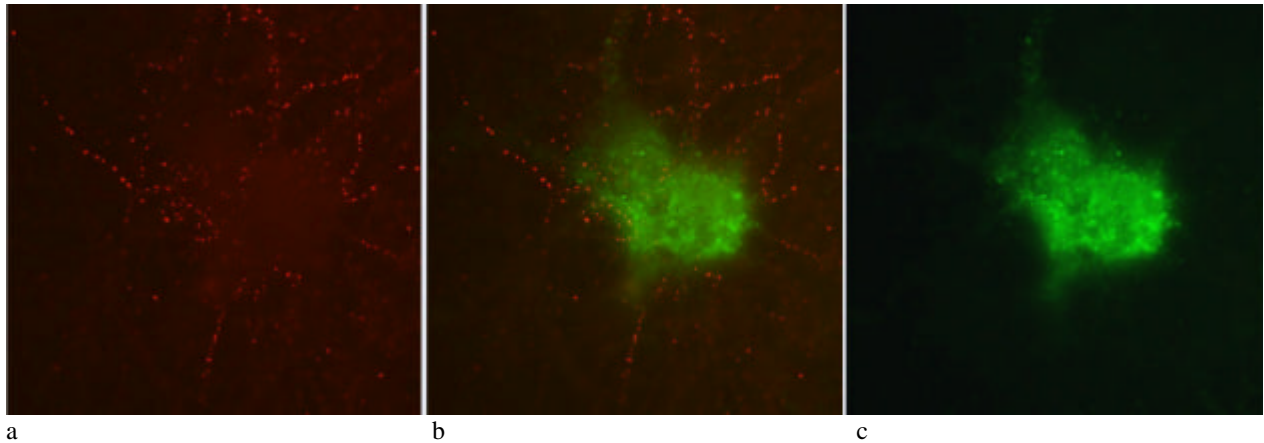


Figura n.21. **Immunocitochimica.** In (a) neuroni d'ippocampo colorati con il siero della paziente (reattività evidenziata con rodamina) ed in (c) con siero di paziente con anticorpi anti-VGKC (fluoresceina). In (b) doppia immunocolorazione non si evidenzia co-localizzazione.

IMMUNOCITOCHIMICA SU CELLULE HEK-293 TRANSFETTATE

Allo scopo di valutare se la reattività presentata avesse come antigene l'NMDAR si sono transfettate le cellule HEK 293 con le sub unità NR1 e NR2b della proteina recettoriale, sub unità che sono state dimostrate essere l'antigene riconosciuto dagli anticorpi presenti in pazienti con encefalite associata a teratoma dell'ovaio. Si è inoltre co-transfettato il dna per la proteina gfp, una proteina che produce una fluorescenza verde che consente di visualizzare le cellule vitali correttamente transfettate. Il siero della nostra paziente non ha dimostrato di riconoscere le subunità NR1/NR2 (figura n 23) riconosciute invece dal siero di controllo di una paziente con anticorpi anti-NMDAR (figura n.22). Da questa analisi si deduce che il siero della nostra paziente non ha lo stesso target antigenico di quello riconosciuto dagli anticorpi anti-NMDAR.

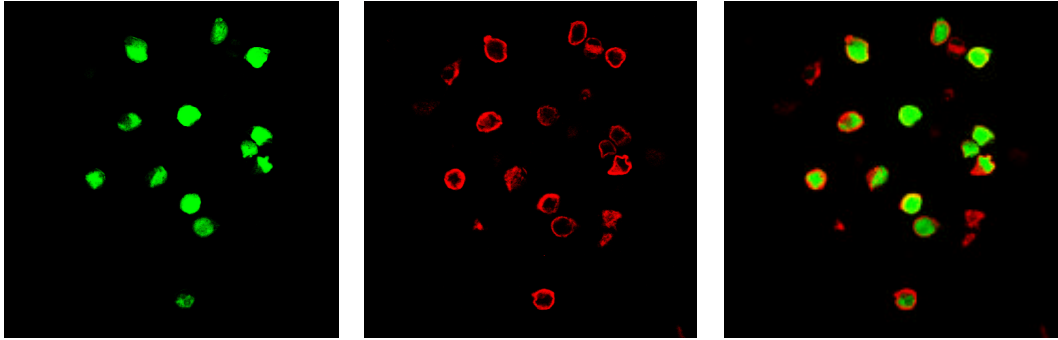


Figura 22 Immunocitochimica su cellule HEK transfettate con DNA Per NR1, NR2b e gfp. in verde (a destra) attività prodotta dalla gfp , in centro quella prodotta da anticorpo reattivo contro il recettore NMDAR. (paziente con teratoma dell'ovaio ed encefalite limica) A sinistra si dimostrano entrambe le reattività.

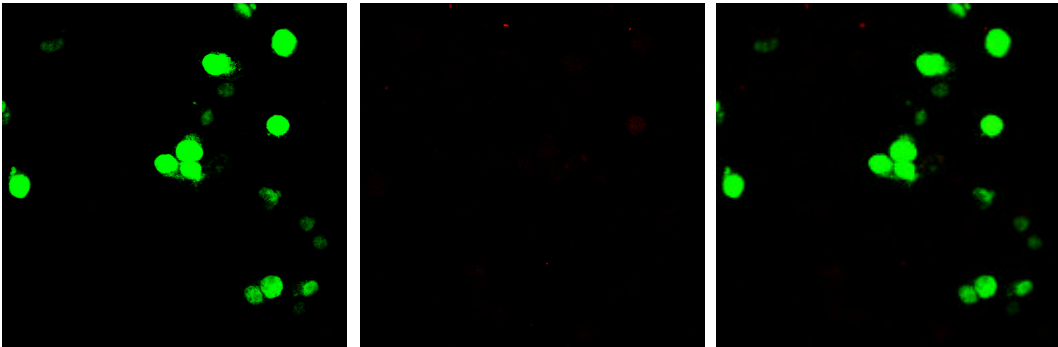


Figura 23 Immunocitochimica su cellule HEK transfettate con DNA Per NR1, NR2b e gfp. in verde la reattività prodotta dalla gfp, al centro si sarebbe dovuta evidenziare una fluorescenza rossa (rodamina) se il siero della nostra paziente avesse riconosciuto le sub unità NR1 o NR2b.

IDENTIFICAZIONE DELL'ANTIGENE

Allo scopo quindi di identificare l'antigene riconosciuto da questo anticorpo neuroni vivi di ippocampo di ratto sono stati incubati con il siero del paziente e l'antigene immunoprecipitato. Questo studio ha prodotto una banda distintiva a 100 KD che mediante studio di spettroscopia di massa ha dimostrato di corrispondere alle sub unità GluR1 e GluR2 del recettore per il glutammato tipo AMPA (a-ammino-3idrossi-5 metil-4 isossazolpropionico acido). Tale reattività è stata in seguito confermata mediante immunoblot con anticorpi specifici per ogni sub unità. Tale analisi è stata compiuta in collaborazione con il Dipartimento di Neuologia e Neuroscienze dell'Università di Pennsylvania a Philadelphia (USA). In seguito le cellule HEK sono state transfettate con le sub unità GluR1 e/o GluR2. Il siero della nostra paziente ha dimostrato di reagire principalmente con la sub unità GluR2.

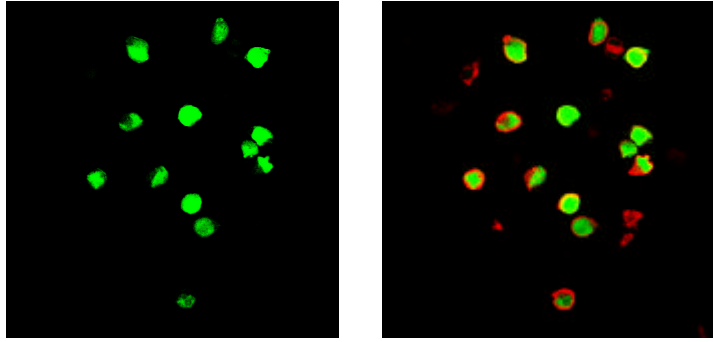


Figura 24 Immunocitochimica su cellule HEK tranfettate con DNA Per GluR1 e GluR2. In verde la reattività prodotta dalla gfp ,in rosso quella prodotta dal siero della paziente che reagisce solo con la sub unità glur2.

DISCUSSIONE

Lo stato dell'arte sulle SNP, essendo queste malattie rare, si basa su piccole serie di pazienti spesso provenienti da un singolo centro. Per tale motivo è stato realizzato un database per le SNP (PNS-Euronetwork) che ci permettesse di raccogliere informazioni su di un alto numero di pazienti e quindi di acquisire nuove o più accurate informazioni su queste malattie. In questo studio si è voluto analizzare in maniera dettagliata il gruppo di pazienti affetti da ELP. Lo scopo era quello di mettere in luce eventuali peculiarità di questo gruppo di pazienti che possano essere utili anche nel confronto di forme encefalite limbica autoimmune non paraneoplastica, che stanno suscitando un sempre maggiore interesse. Nel database Europeo sono stati inclusi 917 pazienti con diagnosi di SNP probabile o possibile secondo i criteri di Graus et al, riassunti in tabella n.17 [129]. Di questi pazienti il 52% (477 pazienti) erano affetti da sindromi neurologiche con coinvolgimento del SNC. I pazienti con ELP costituiscono quindi, nel nostro gruppo, l'11.3% del totale delle SNP e il 21.8% di quelle con coinvolgimento del SNC. A nostra conoscenza questa è la più ampia serie di pazienti con ELP mai descritte.

Tabella n.17. **Criteri diagnostici per le Sindromi neurologiche Paraneoplastiche**. [129]

| SNP definita |
|--|
| 1. Sindrome classica e presenza di tumore che si sviluppa entro cinque anni dalla diagnosi della sindrome neurologica |
| 2. Sindrome non classica che si risolve o migliora in maniera significativa dopo il trattamento del tumore associato senza una concomitante immunoterapia, provato che la sindrome non sia suscettibile di miglioramento spontaneo |
| 3. Sindrome non classica con anticorpi anti neurone (ben caratterizzati o non) e tumore che si sviluppa entro cinque anni dalla diagnosi della sindrome neurologica |
| 4. Sindrome neurologica (classica o no) in presenza di anticorpi ben caratterizzati (anti-Hu, Yo, CV2, Ri, Ma2 od amfifisina) senza tumore. |
| SNP possibile |
| 1. Sindrome classica, assenza di anticorpi anti neurone, non tumore, ma elevata probabilità di avere una neoplasia. |
| 2. Sindrome neurologica (classica o non) con un anticorpo onconeurale parzialmente caratterizzato e non tumore |
| 3. Sindrome non classica, non anticorpi onconeurale e tumore presente entro due anni dall'esordio della sindrome neurologica. |

Sindromi classiche= encefalo mielite, encefalite limbica, degenerazione cerebellare, opsoclonomiocloni, neuronopatia subacuta, pseudo ostruzione intestinale cronica, sindrome miastenica di Lambert ed Eaton, Dermatomiosite.

ENCEFALITE LIMBICA PARANEOPLASTICA

1. RISPETTO DEI CRITERI DIAGNOSTICI PROPOSTI DA GRAUS ET AL 2004.

Pur potendo essere inseriti nel database sia pazienti con diagnosi di SNP definita che possibile, tutti i pazienti coinvolti nel nostro studio avevano un'ELP definita in accordo con i criteri di Graus et al [129]. Infatti, tutti avevano un'encefalite limbica, che è considerata una sindrome "classica", in associazione od alla presenza di anticorpi anti-neurone "ben codificati" oppure alla presenza di una neoplasia diagnosticata entro 5 anni dall'esordio clinico od alla risposta clinica della sindrome neurologica dopo il trattamento del tumore. I pazienti sono stati classificati come ELP definita: in 92 casi per la presenza di tumore, in 10 casi per la presenza di un anticorpo ben caratterizzato pur in assenza di tumore ed in 2 casi per la risposta della sindrome neurologica alla terapia del tumore. Gli ultimi 2 casi comprendevano pazienti senza anticorpi uno con un tumore gastrico ed un'altro con tumore renale.

2. CARATTERISTICHE CLINICHE DELL'ENCEFALITE LIMBICA

PARANEOPLASTICA: CONFRONTO CON I DATI DELLA LETTERATURA.

In letteratura sono riportate due altre casistiche di pazienti affetti da ELP [35,72]. In queste due casistiche l'ELP è definita avere una lieve predominanza maschile (Gultekin et al. Rapporto maschi/ femmine 1.2:1) oppure femminile (Vernino et al rapporto maschi e femmine 1:1.2). Nel nostro studio (tabella n.18), a differenza dei precedenti, si è riscontrata una maggiore differenza tra i due sessi con una più evidente predominanza nel sesso maschile (rapporto maschi:femmine di 1.8:1). Invece, l'età media d'insorgenza era simile nelle diverse casistiche e i dati riportati concordano anche con i nostri. È noto che sotto la diagnosi di ELP è suggerita dallo sviluppo subacuto in giorni-settimane di un quadro clinico definito dalla presenza di almeno uno dei seguenti sintomi: crisi epilettiche, deficit di memoria a breve termine, confusione e sintomi psichiatrici che sono indicativi del coinvolgimento del sistema limbico. Un deficit di memoria a breve termine viene riportato in letteratura come il sintomo più frequentemente associato all'ELP ed è identificato in una percentuale di pazienti pari al 84%. Anche nel nostro gruppo era il sintomo più frequente anche se in percentuale lievemente inferiore: 77% dei casi. Altre manifestazioni di disfunzioni cognitive non sono riportate in letteratura in maniera dettagliata se non in singoli casi. Il nostro studio è quindi il primo a descrivere lo spettro di manifestazioni neuropsicologiche in una vasta coorte di pazienti

seppure con la limitazione di aver potuto analizzare solo le conclusioni riportate dai singoli esaminatori, mentre per la maggior parte dei pazienti non erano disponibili dettagliati test neuropsicologici che quantificassero l'entità del disturbo. Si è dimostrato che un disorientamento spazio temporale è presente nel 39.4% dei casi, mentre più raramente sono descritti sintomi indicativi di un coinvolgimento delle aree prefrontali quali una sindrome disesecutiva (5.7%), rallentamento ideomotorio (4.8%) e deficit di attenzione (3.8%). Altri sintomi quali afasia e aprassia sono stati diagnosticati solo in singoli casi. Sintomi psichiatrici sono stati riscontrati nel 52.8% dei pazienti, percentuale lievemente è superiore a quella riportata in letteratura dove è pari al 42%-50%. I sintomi riscontrati consistevano principalmente in alterazioni di personalità (28.8%), deflessione del tono dell'umore (17.3%) e stato ansia e di agitazione (17.3%). Rare erano invece le allucinazioni visive (2.8%) o quadri di franca psicosi (0.98%).

La presenza di uno stato confusionale è risultato nel nostro gruppo il secondo sintomo per frequenza ed è stato identificato nel 54.8% dei casi; in percentuale superiore a quella riportata in letteratura che è del 46%. Non è stato possibile correlare tale sintomo alle alterazioni elettroencefalografiche in quanto, i dati riguardanti l'EEG erano disponibili solo per un numero limitato di pazienti per cui è possibile che il dato sia sovrastimato e che in questo gruppo siano compresi anche alcuni pazienti con forme di epilessia complessa anche alla luce della non elevata percentuale di pazienti con tale sintomatologia presenti nel nostro gruppo. Infatti, in letteratura è riportata una frequenza di crisi epilettiche pari al 50%-58% con una frequenza di crisi di tipo parziale complesso d'origine temporale del 20%. Nel nostro studio invece crisi epilettiche erano presenti in percentuale inferiore sia come totale (44.2%) che come percentuale di crisi parziali complesse (16.3%). Tale differenza potrebbe essere attribuita alla maggiore numerosità campionaria della nostra serie rispetto alle precedenti. Inoltre nel nostro studio il 14.4% dei pazienti aveva crisi epilettiche di tipo focale motorie. Nel 60% di questi casi sono state riscontrate all'EEG onde puntute a sede frontale. Pertanto, in questi pazienti, l'attività epilettogena riscontrata a livello frontale è giustificativa della semeiologia delle crisi e potrebbe essere spiegata da una'estensione del processo infiammatorio al di fuori delle aree limbiche.

Tabella n18. **Sintomi clinici nei pazienti con encefalite limbica paraneoplastica: confronto con i dati di letteratura.**

| | Nostro studio (104 casi) | Gultekin et al.[35] (50 casi) | Lawn et al [72] (24 casi) |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Sesso | 66M e38F (1.8:1) | 27M e23F (1:1.2) | 9M e15F (1:1.6) |
| Età media | 61.5 | 55 | 61 |
| Deficit di memoria | 77% | 84% | 92% |
| Stato confusionale | 54.8% | 46% | - |
| Crisi epilettiche | 44.2% | 50% | 58% |
| Sintomi psichiatrici | 52.8% | 42% | 50% |

3. TUMORE ASSOCIATO

Una neoplasia associata all'ELP è stata riscontrata nel 90% dei pazienti. Nella maggior parte (80%) il riscontro della neoplasia è stato successivo alla diagnosi del tumore, mentre nel 20% era nota la presenza del tumore al momento dell'esordio dei sintomi clinici. Nel nostro gruppo il numero di pazienti con tumore non noto al momento dell'esordio dei sintomi è maggiore rispetto a quello riportato in letteratura che è del 60% circa. Questo potrebbe essere dipendente da un bias di selezione dei pazienti negli studi precedenti essendo questi di tipo retrospettivo, mentre il nostro studio è almeno in parte prospettico, per cui sono stati inseriti inizialmente anche pazienti in cui il tumore non era noto e nei quali questo è stato identificato durante il follow up. Il tempo mediano d'identificazione del tumore è stato pari a 2.5 mesi, non dissimile da quello riportato in casistiche precedenti (circa 3 mesi), così come il tempo di insorgenza della sindrome neurologica rispetto alla diagnosi di tumore che è stato in media di 6 mesi (circa 5 mesi in altre casistiche).

Sotto il profilo del tipo di tumore associato all'ELP la nostra casistica conferma i dati di letteratura. Infatti, il tumore più frequentemente riportato associato all'ELP è era lo SCLC (44%) seguito dal tumore testicolare (9.6%) e dal tumore della mammella (5%). Verranno discusse le forme di tumore più frequentemente associate alla ELP e la particolare associazione con tumore gastrico che non è mai stata descritta in letteratura.

ENCEFALITE LIMBICA E SCLC

Pur essendo noto che il tumore più frequentemente associato all'ELP è lo SCLC esiste un solo studio in letteratura, condotto da Alamowitch et al., che analizzi le caratteristiche di questo sottogruppo di pazienti [131]. Nel nostro studio 41 pazienti presentavano una ELP associata a SCLC ed erano 27 maschi e 14 femmine di età mediana pari a 63 anni (range 47-83). Nel nostro gruppo l'83% (34/41) dei pazienti contro il 50% di quelli descritti da Alamowitch avevano anticorpi anti-Hu. Si rimarca con questo dato che gli anticorpi anti-Hu sono un marcatore di SCLC nei pazienti con ELP [9,131]. Inoltre, nel sottogruppo di pazienti con SCLC e anticorpi anti-Hu è stata diagnosticata un'ELP "plus" in 16 casi per cui non possiamo affermare che l'encefalite limbica associata a SCLC si caratterizza per un più frequente interessamento multifocale del sistema nervoso come riportato da Alamowitch. Questo viene confermato anche se confrontiamo i casi di ELP "plus" e SCLC con o senza anticorpi anti-Hu. I nostri dati confermano che solo pochi pazienti con ELP e SCLC migliorano dopo il trattamento del tumore [9, 35, 131, 132]. Infatti, solo 7/41 (17%) pazienti con encefalite limbica e SCLC hanno presentato miglioramento clinico con il trattamento del tumore.

ENCEFALITE LIMBICA E TUMORE TESTICOLARE

In letteratura il tumore testicolare è considerato secondo per frequenza dopo lo SCLC nei pazienti con ELP [35]. Più recentemente è emerso che tale tipo di tumore correla soprattutto con una sindrome neurologica che comprende oltre che all'ELP anche sintomi d'interessamento del tronco e del diencefalo [46]. Nel nostro studio questo tumore è stato diagnosticato nel 9.6% dei casi, in una percentuale significativamente inferiore rispetto a quella del 20% riportata in letteratura. Come noto dai dati di letteratura anche nel nostro studio è confermato che i pazienti sono maschi giovani (l'età media di questo gruppo di pazienti nel nostro studio era pari a 36.2 anni con range 21-69). Nei nostri casi il quadro neurologico è stato caratterizzato da un'encefalite limbica pura nell'80% dei casi e plus nel 20% casi. In questi casi la sintomatologia aggiuntiva interessava il tronco encefalico con coinvolgimento dei nervi oculomotori. In tutti i pazienti è stata riscontrata la presenza di anticorpi anti-Ma2 per cui anche nella nostra casistica vi è una stretta associazione fra questo anticorpo e lo sviluppo di un tumore testicolare. Il tumore testicolare fra i restanti 813 pazienti inseriti del database è stato riscontrato in altri 5 casi di cui due con encefalite del tronco, uno con degenerazione cerebellare, uno con encefalite diencefalica ed 1 con neuronopatia

sensitiva. Si sottolinea pertanto come questo tumore sia raramente associato a SNP e come si riscontri più frequentemente in pazienti con ELP e/o encefalite del tronco. In questi altri 5 casi 4 avevano anticorpi anti Ma2 ed un paziente non aveva anticorpi. Quindi si ribadisce la stretta associazione fra neoplasia testicolare e anticorpi anti-Ma2. Una risposta della sindrome neurologica alla terapia del tumore si è avuta in 4 casi. Confrontando la risposta della sindrome neurologica al trattamento del tumore dei pazienti con neoplasia del testicolo versus altre neoplasie e non è stata dimostrata alcuna differenza statisticamente significativa. Nel nostro gruppo, differenza dei dati di letteratura, non sembra esservi una maggiore risposta al trattamento oncologico in questo gruppo di pazienti.

ENCEFALITE LIMBICA E TUMORE ALLA MAMMELLA

Un tumore alla mammella è stato riscontrato nel 5.3% dei nostri casi mentre in letteratura è riportata una percentuale di associazione dell'8% essendo comunque il tumore alla mammella, il terzo per frequenza dopo il tumore al polmone e testicolare. I casi descritti in letteratura sono stati associati ad anticorpi anti-Ma2 o non sono stati identificati anticorpi e comunque non ci sono lavori che abbiano come target la valutazione dell'encefalite limbica nella popolazione di pazienti con tumore della mammella che si ritiene comunque infrequente. In letteratura c'è un solo lavoro sulle sindromi neurologiche paraneoplastiche associate e tumori ginecologici e della mammella effettuata da Rojas–Marcus et al., e questi autori hanno identificato un solo caso di encefalite limbica associato a tumore della mammella [133]. Le caratteristiche dei nostri pazienti sono riassunte in tabella n.19. Dai nostri dati l'ELP associata a neoplasia della mammella si caratterizza per essere una sindrome pura 4/5 casi, in cui non si osserva un anticorpo preferenzialmente associato e l'esame del liquor e la MRI sono generalmente patologici. La risposta alla terapia oncologica (1/5) e immunomodulatoria soprattutto con steroidi (2/5) è possibile in alcuni casi. In nessuno di nostri casi si è avuto decesso per evoluzione della malattia oncologica e in un solo caso come conseguenza della SNP.

Tabella. n.19. **Caratteristiche dell'ELP associata a tumore della mammella nella nostra casistica.**

| Età | Stadio | Diagnosi | ELP | Anticorpo | esame liquor | | | RMN | Risposta TO | Outcome |
|-----|-----------|-------------------|------|------------|--------------|-----|----|------------|-------------|----------|
| | | | | | C | P | B | | | |
| 70 | Locale | 32 mesi dopo SNP | Pura | No ab | 3 | 25 | - | Patologica | Si | RS3 |
| 79 | Locale | 18 mesi dopo SNP | Pura | Ma2 | 7 | 48 | Si | Patologica | N/A | RS1 |
| 65 | Regionale | 23 mesi prima SNP | Pura | Amfifisina | 7 | 45 | - | Patologica | N/A | Deceduta |
| 68 | Locale | 24 mesi dopo SNP | Pura | CV2 | 0 | 55 | No | Patologica | No | RS2 |
| 61 | Locale | 8 mesi prima SNP | Plus | AMPAR | 26 | 430 | - | Normale | No | RS3 |

ENCEFALITE LIMBICA E TUMORE GASTRICO

Tra gli altri i tumori associati all'ELP, si vuole sottolineare il riscontro di una neoplasia gastrica. In letteratura sono riportati casi di associazione con tumori del tratto gastro-enterico, dell'esofago e del colon, ma a nostra conoscenza non sono stati segnalati casi di possibile associazione con neoplasia gastrica. Nel 2004 Mori et al., descrivevano un caso di encefalite limbica senza anticorpi con storia di tumore gastrico otto anni prima dell'esordio clinico e senza riscontro di recidiva di neoplasia per cui gli stessi autori non consideravano tale neoplasia associata alla sindrome neurologica [134]. Nel nostro studio sono stati riportati due pazienti con tumore gastrico. Il primo caso, un uomo di 61, si presentava nel giugno del 2004 con una sintomatologia clinica caratterizzata da deficit della memoria, confusione, disorientamento S/T e disinibizione. All'EEG è stato riscontrato un rallentamento diffuso, mentre alla RNM encefalica sono state evidenziate alterazioni di segnale nelle sequenze a TR lungo delle aree limbiche. Gli esami ematochimici di routine erano nella norma, mentre l'esame del liquor ha evidenziato un lieve incremento della concentrazione proteica (60 mg/dl). Un mese dopo l'esordio clinico è stato riscontrato un adenocarcinoma gastrico che è stato asportato chirurgicamente. Il paziente ha in seguito presentato un miglioramento clinico passando da MMSE di 15/30 a uno di 25/30 e da un livello di disabilità misurato con la Scala di Rankin (RS) di quattro a uno di due, a cinque mesi dall'esordio clinico. Le condizioni cliniche dal paziente rimangono stabili a un follow up di tre anni. Il secondo caso, un maschio di 66 anni, con una storia di adenocarcinoma gastrico trattato con sola chirurgia, a 4 mesi dal

riscontro della neoplasia gastrica ha sviluppato un quadro di encefalite limbica. Il quadro clinico si caratterizzava per la comparsa di crisi epilettiche parziali complesse con secondaria generalizzazione, stato confusionale, disorientamento S/T, cefalea e calo ponderale. La sintomatologia clinica del paziente è in seguito progredita fino al coma e al decesso come conseguenza della sindrome neurologica a due mesi dall'esordio clinico. L'EEG aveva evidenziato la presenza di onde puntute a livello fronto-temporale bilaterale con associata attività lenta nelle stesse aree. Gli esami ematochimici di routine erano nella norma e l'esame del liquor evidenziava 17 leucociti/mm³, una concentrazione proteica di 91 mg/dl ed un quadro di mirror pattern all'isoelettrofocusing, mentre la RNM encefalica ha evidenziato la presenza di alterazione di segnale nelle aree limbiche. Entrambi questi due casi sono secondo i criteri di Graus dei casi d'ELP definita. Il primo caso oltre ad essere definito per la presenza di tumore lo è anche poiché ha presentato una risposta alla terapia oncologica, mentre nel secondo caso si potrebbe mettere in dubbio l'associazione tra tumore e SNP per il fatto di non aver riscontrato una recidiva della neoplasia stessa. Tuttavia, in questo secondo caso, la stretta correlazione temporale tra sindrome neurologica e tumore, il trattamento solo chirurgico di quest'ultimo, che esclude eventuali complicanze legate a radio e chemioterapia e l'esclusione di altre cause che potessero giustificare la sintomatologia clinica supporta la nostra diagnosi d'ELP. Questo riscontro è particolarmente importante in quanto, apre lo spettro dei tumori che possono essere associati all'encefalite limbica. Al momento nel siero di entrambi questi pazienti non è stato rinvenuto alcun anticorpo anti-neurone. È possibile però che, l'applicazione di nuove metodiche e la raccolta di altri casi, ci consentirà di riconoscere anche in questo gruppo di pazienti nuove reattività anticorpali che possano essere utili come marcatori di malattia oltre che nella comprensione dei meccanismi patogenetici implicati nella genesi dell'ELP.

4. ESAME DEL LIQUOR

Nel nostro studio, sulla base di un consenso tra i membri del gruppo, è stato deciso che un esame del liquor sarebbe stato considerato patologico qualora fosse presente almeno uno dei seguenti parametri: contenuto in cellule superiore a 5/mm³ e/o una concentrazione proteica uguale o superiore a 50 mg/dl e/o la presenza di bande oligoclonali. Utilizzando tali limiti abbiamo riscontrato un liquor patologico nel 70% dei casi una percentuale simile a quella di

altre casistiche che hanno riportato valori tra il 64% e il 78% [35, 72]. Se analizziamo i singoli parametri (figura n.25) questi non erano significativamente alterati. Infatti, se guardiamo alla distribuzione del numero di pazienti per numero di cellule sul liquor osserviamo che solo 3 pazienti avevano un numero di cellule superiore a 50, e che un numero circa uguale di pazienti aveva un numero di cellule inferiore (43/83) o superiore (40/83) a 5. Anche per quanto riguarda le proteine si è rilevato che un numero circa uguale di pazienti aveva un contenuto proteico inferiore (35/78) o superiore (43/78) a 50 mg/dl, tuttavia 15 pazienti avevano valori superiori a 100 mg. Non abbiamo analizzato in dettaglio la presenza/ assenza di bande oligoclonali poiché queste sono state ricercate in soli 37 casi. Si può quindi concludere che, sebbene la maggior parte dei pazienti abbia un liquor patologico, questo può essere dovuto all'aumento del contenuto proteico e/o del contenuto cellulare. Questi parametri quando analizzati singolarmente invece non sono significativamente alterati e che comunque la concentrazione proteica sembra essere quindi il parametro liquorale più alterato nei pazienti con ELP.

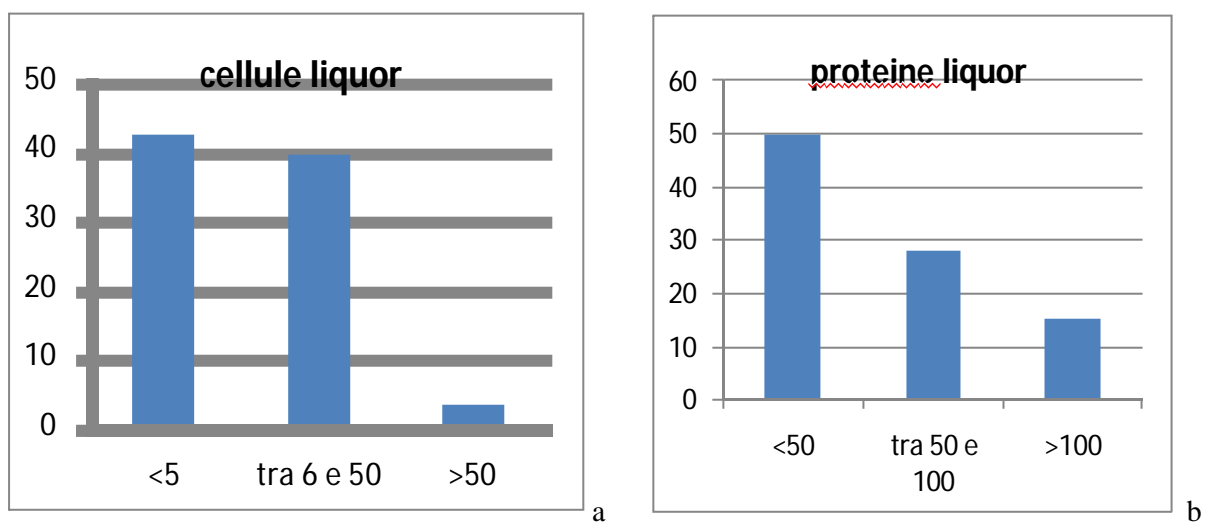


Figura.n 25. **Confronto del numero di casi con il contenuto cellulare (a) e proteico (b) sul liquor dei pazienti con ELP.**

Abbiamo quindi voluto vedere se la presenza di un liquor alterato o normale fosse legata al momento di esecuzione dell'esame rispetto all'esordio dei sintomi neurologici. Per convenzione, sulla base di un consenso fra i membri del gruppo, è stabilito che il limite temporale dovesse essere di 3 mesi. Nella nostra casistica il 78.3% dei pazienti aveva eseguito l'esame del liquor a meno di 3 mesi e non è emersa una differenza significativa ($p=0.8077$ t. Chi quadro) nel confronto degli esami eseguiti a meno o più di 3 mesi. In particolare non si sono rivelate differenze nel numero mediano di cellule che era pari a $5/\text{mm}^3$ negli esami

eseguiti a meno di 3 mesi e di $4/\text{mm}^3$ in quelli eseguiti a più di tre mesi, tuttavia è stata osservata un'ampia variabilità nel contenuto cellulare con un range di cellule che variavano da 0 a $208/\text{mm}^3$ nei liquor eseguiti a meno di tre mesi, mentre tale variabilità si riduceva in quelli a liquor eseguito a più di 3 mesi in cui il range è stato 0-32 cellule. Per quanto attiene alla concentrazione proteica, questa era più alterata nei pazienti con liquor eseguito a meno di 3 mesi anche se si è riscontrata una maggiore variabilità nel gruppo con liquor a più di 3 mesi (range proteico 10-480 mg/dl nel gruppo a più di 3 mesi versus range di 30-910 mg/dl nel gruppo a più di tre mesi). In 10 pazienti si sono ottenuti esami del liquor seriali ed in tutti tranne uno è stata evidenziato in decremento nel tempo del numero di cellule, mentre la concentrazione proteica si è ridotta in 7/10 pazienti. Questi dati supportano l'idea che nell'ELP vi sia una fase maggiormente infiammatoria iniziale con maggiore coinvolgimento cellulare e che comunque una certa attività infiammatoria si mantenga nel tempo dimostrata dalla persistenza di alterazioni del contenuto proteico.

Abbiamo inoltre correlato la presenza di alterazioni liquorali con l'outcome clinico ed abbiamo osservato che il 62% (5/8) sono deceduti come conseguenza della SN sia nel gruppo con liquor normale (5/8) che in quello con liquor patologico (16/26). Non sembra quindi che avere un liquor patologico sia correlato a una maggiore probabilità di decesso soprattutto come conseguenza dell'evoluzione della sindrome neurologica e sia quindi fattore predittivo negativo per l'outcome.

Abbiamo infine correlato la presenza di alterazioni liquorali con la risposta alla terapia immunomodulante. Abbiamo osservato che il 23% (8/25) dei pazienti con liquor normale è stato trattato con terapia immunomodulante e il 50% (4/8) ha avuto risposta da tale trattamento, mentre il 52% (30/58) dei pazienti con liquor alterato è stato sottoposto a trattamento con terapia immunomodulante ed il 36% (11/30) ha mostrato risposta. Da questi dati si evince che i pazienti con liquor alterato sono stati trattati più spesso di quelli con liquor normale, ma che la presenza di un liquor alterato non sembra correlare con una migliore risposta clinica alla terapia. Tuttavia il numero di pazienti trattati è esiguo e le terapie non omogenee per cui queste osservazioni necessitano di conferma.

5. RISONANZA MAGNETICA ENCEFALICA

È ben noto che nei pazienti con ELP si riscontrino alterazioni a livello ippocampale unilaterale o bilaterale e che queste siano meglio evidenziate nelle sequenze a TR lungo e questo dato è confermato anche nel nostro studio. Come nelle serie precedenti anche nel

nostro gruppo una quota di pazienti ha un esame di neuro immagine normale. Nella nostra casistica la percentuale di pazienti con RNM normale era del 26.7% ed era inferiore rispetto a quella riportata da Gultekin et al., (36%) e da Lawn et al. (28%). Nell'11% dei pazienti con RNM normale è stata dimostrata la presenza di alterazioni al livello delle aree limbiche con l'utilizzo della PET cerebrale (Figura 36) In nessuno dei pazienti in cui è stata eseguita la PET venivano segnalate crisi epilettiche. In un paziente è invece stata riscontrata la presenza di infiltrato infiammatorio a livello ippocampale all'esame istologico dopo autopsia (Figura 37)

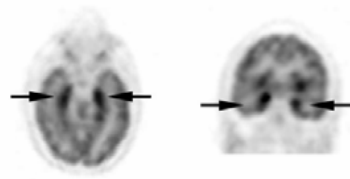


figura 26 FDG-PET encefalica. **Immagine di un paziente con RNM encefalica normale e riscontro alla FDG-PET d'ipermetabolismo nelle zone limbiche**

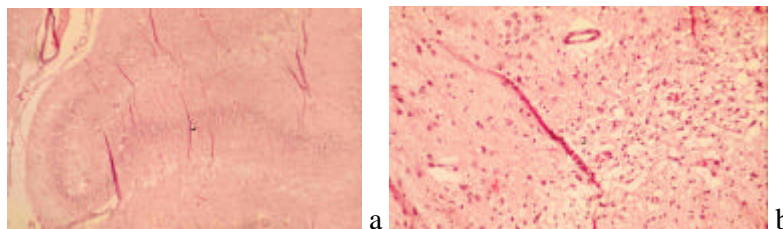


Figura 27. **Autopsia di un paziente con ELP.** Preparato anatomico sezione di ippocampo in ematossilina eosina di un paziente con ELP, SCLC ed anticorpi anti Hu. in b si apprezza la presenza di Perdita neuronale e di infiltrato linfocitario. (a. ingrandimento 5x, b. ingrandimento 20x)

Dai nostri dati emerge quindi che almeno un 30% dei pazienti ha una RNM encefalica normale e che l'utilizzo di altre metodiche con convenzionali come la PET può aiutare nel confermare la presenza del coinvolgimento del sistema limbico in pazienti con sospetta ELP. Confermando pertanto i dati di letteratura [34] Si è osservato inoltre che sebbene la necessità di confermare la presenza di alterazioni del sistema limbico in pazienti con sospetta ELP sia mandatorio secondo i criteri di Graus et al., per porre diagnosi di ELP, nel 22% dei nostri casi questo non viene rispettato. In questi casi la diagnosi è stata posta in base alla presenza di un quadro clinico compatibile associato alla presenza di anticorpi anti neurone e/o di un tumore. Dovremmo quindi considerare se questi tre elementi siano sufficienti per porre una

diagnosi di ELP. E se riteniamo che non sia necessaria la conferma del coinvolgimento del sistema limbico con metodiche di neuro-immagine o con dati istologici i criteri di Graus et al. dovrebbero essere rivisti. È nostra opinione che un quadro clinico suggestivo in presenza di una neoplasia e/o di anticorpi antineurone correlati sia elemento sufficiente per la diagnosi di ELP. Va ricordato che l'utilizzo della PET può essere utile nei casi con RNM encefalica negativa per confermare tale indirizzo diagnostico, ma questa metodica è costosa e non disponibile in tutti i centri, mentre potrebbe essere importante pensare in questi rari casi di ottenere una conferma istologica biptica e/autoptica.

Il 17.6% dei nostri pazienti ha mostrato alla RNM encefalica la presenza di un coinvolgimento anche di aree diverse dalla regione temporale mesiale. In questo gruppo di pazienti non è stata evidenziata però alcuna correlazione tra le aree extralimbiche coinvolte e la sintomatologia clinica riportata. È possibile quindi che in almeno in alcuni casi il processo patologico sia più diffuso anche se non clinicamente evidente cosa che per altro era già stata riportata nelle prime segnalazioni di Birierly et al.[24]. Infine in tre dei nostri pazienti non sono state riscontrate alterazioni ippocampali pur essendo stata la RNM encefalica non normale: un caso alterazione a sede frontale nelle sequenze pesate in T2, un caso con alterazioni multiple simil vasculitiche ed il terzo caso con alterazioni bi occipitali e fronto-parietali nelle sequenze pesate in T2. Clinicamente i pazienti presentavano rispettivamente un'ELP pura, un ELP con bradicardia e scialorrea e nell'ultimo caso con mioclonie, parestesie facciali, e disautonomia. Anche in questi tre casi la diagnosi di sindrome paraneoplastica era confermata dalla presenza di un tumore associato e/o di anticorpi anti-neurone.

6 ENCEFALITE LIMBICA E TERAPIA

Non esiste per i pazienti affetti da SNP un protocollo terapeutico approvato e basato su trial clinici rigorosi. I dati disponibili si basano su reports sporadici e su opinioni di esperti. Nel nostro studio abbiamo analizzato a quale tipo di trattamento sono stati sottoposti i pazienti affetti da ELP. Si è riscontrato che il 45.2% dei pazienti è stato sottoposto a un trattamento immunomodulatorio e che il trattamento preferenzialmente utilizzato era quello steroideo (83% dei pazienti trattati). Il 34% dei pazienti trattati con farmaci immunomodulanti ha presentato un miglioramento clinico, anche se non è stato possibile quantificare l'entità del miglioramento non essendo state messe in atto scale di valutazione specifica ed essendo il dato solo segnalato dal medico che aveva in carico il paziente e che non era lo stesso per tutti i casi. Tuttavia segnaliamo che nei casi in cui si è ottenuto un miglioramento, sono stati sempre

utilizzati corticosteroidi od immunosoppressori, mentre in 6 casi in cui sono stati usati isolatamente od in associazione IVIg e PA non si è riportato alcun miglioramento clinico. Si potrebbe quindi supporre almeno da una prima osservazione che queste terapie non sono efficaci nei pazienti con ELP. Comunque, occorrono studi più rigorosi per sostenere tale iniziale osservazione. Segnaliamo inoltre che 6 dei nostri pazienti avevano anticorpi diretti contro antigeni di superficie (2 anti-VGKC, 1 anti-VGCC, 2 anti-NMDAR, 1 anti-AMPA) e che tutti i pazienti trattati con terapia immunomodulatoria, 2 con soli steroidi, 2 con steroidi e IVIg ed 1 con steroidi, IVIG e PA, hanno risposto al trattamento. Questo conferma i dati recentemente riportati da Dalmau et al [36].

7 OUTCOME

Il 48% dei pazienti con ELP è deceduto e di questi il 62% come conseguenza della sindrome neurologica ad un tempo medio di 8.8 mesi dall'esordio clinico (range 1.5-32 mesi) con mediana a 6 mesi. L'ELP è quindi una malattia severa che causa il decesso in tempi rapidi. Tuttavia i pazienti che sopravvivono a differenza di altre SNP non rimangono severamente disabili, il mRS medio dei nostri pazienti era infatti pari a 2.

CONFRONTO ENCEFALITE LIMBICA “PURA” VERSUS ENCEFALITE LIMBICA “PLUS”

Nella nostra casistica si è osservato che il 47% dei casi aveva un quadro clinico che comprendeva la presenza di altri segni e sintomi oltre a quelli dell'encefalite limbica. Supponendo che questo gruppo potesse sottendere una patologia diversa con interessamento più diffuso del sistema nervoso e che questo potesse avere delle implicazioni in termini diagnostici e prognostici si è deciso di confrontare i due gruppi di pazienti. I pazienti sono stati suddivisi quindi in un gruppo con encefalite limbica definita “pura” cioè senza altri segni e/o sintomi al di fuori di stato confusionale, deficit di memoria, crisi epilettiche e sintomi psichiatrici e in un gruppo definito “plus” in cui oltre ai sintomi predetti erano evidenti altri segni e/o sintomi (tabella n.6). Si è osservato che i due gruppi non differivano sotto il profilo dell'età e del sesso. Le caratteristiche cliniche che definiscono l'encefalite limbica non si presentavano in maniera diversa riscontrandosi una similare distribuzione di casi di crisi epilettiche, deficit cognitivi, stato confusionale e sintomi psichiatrici. Tra questi ultimi si

riscontrava una differenza statisticamente significativa ($p=0.0406$) solo per il dato *depressione* che risultava più frequente nei pazienti con forma “plus”. Il valore di tale dato è limitato dalla mancanza di scale quantitative di misurazione del grado di depressione. Tuttavia appare può essere giustificato al maggiore impegno clinico del gruppo “plus” rispetto al gruppo pure. Non si sono inoltre osservate differenze nei tempi di diagnosi nei due gruppi. La latenza diagnostica era simile nei due gruppi con mediana in entrambi a 2 mesi. In entrambi i gruppi è stata riscontrata nella maggior parte dei pazienti la presenza di un tumore associato (92.7% nelle forme pure ed 87.7% nelle forme “plus”). Il tumore più frequentemente associato in entrambi i gruppi è stato lo SCLC. Differenze statisticamente significative nel tipo di tumore sono state riscontrate solo per il tumore del testicolo che era più frequente ($p= 0.017$) nel gruppo delle encefaliti limbiche pure. Non si sono dimostrate differenze nemmeno per presenza di anticorpo e per tipo di anticorpo associato. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nelle alterazioni liquorali nei due gruppi di pazienti. Non si sono riscontrate differenze significative nel tempo di esecuzione della RNM encefalica rispetto all’esordio dei sintomi neurologici in entrambi i gruppi così come non sono emerse differenze nella percentuale di esami patologici che è risultata sovrapponibile. Si è osservato inoltre che i pazienti con forma “plus” sono stati trattati più frequentemente (51%) di quelli con forma pura (38%), ma la differenza non era significativa. In entrambi i gruppi il trattamento più frequentemente utilizzato è stato quello corticosteroideo utilizzato nel 90% delle forme pure e nell’80% delle forme “plus”. Le forme pure hanno tuttavia dato maggiore risposta positiva che è stata riscontrata nel 47% contro il 28% nelle forme “plus” tuttavia la differenza non è risultata statisticamente significativa. Se consideriamo solo i pazienti in cui il trattamento sia stato effettuato prima del trattamento del tumore non si ottengono differenze significative. In più anche la percentuale di risposta al trattamento del tumore è stata la medesima nei due gruppi (29%). Non si sono osservate differenze nemmeno nell’outcome dei pazienti (figura n.27)

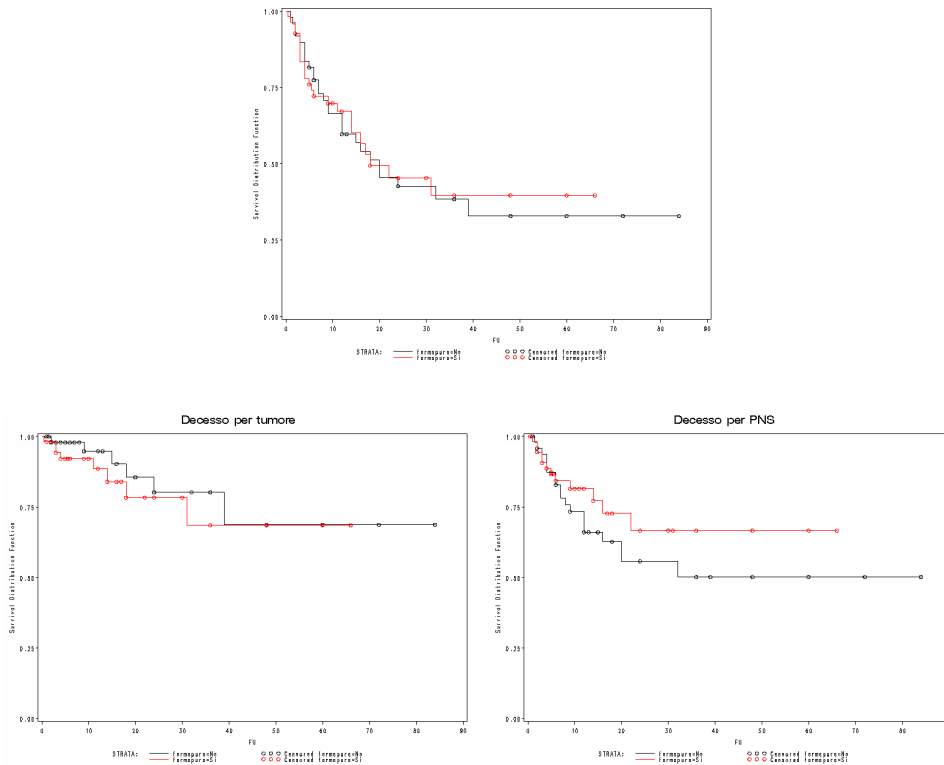


Figura n 28. Vengono riportate le curve di sopravvivenza dei pazienti con ELP “pura” (rossa) e “plus” (nera) suddivise anche per causa di morte.

ENCEFALITE LIMBICA “PLUS” VERSUS ENCEFALOMIELONEURITE

Fino al 1960 si era ritenuto che l’associazione fra malattie neurologiche e tumore riguardasse solo strutture con localizzazione caudale rispetto ai nuclei della base. Nel 1960 Brierley et al.[24], pubblicarono un caso di encefalite subacuta in un uomo con un tumore a piccole cellule del polmone e all’esame anatomopatologico del cervello evidenziarono un’intensa reazione infiammatoria più marcata a livello della porzione mesiale del lobo temporale. Nel 1965 Henson et al.[3], introdussero il termine encefalomielite associata con carcinoma Per descrivere pazienti con neoplasia che presentavano segni clinici di coinvolgimento di parti diverse del sistema nervoso con riscontro autoptico di segni d’infiammazione multifocale. Fu in seguito accettato che l’encefalite limbica era identica all’encefalomielite e che le uniche differenti esistenti fossero un riflesso della distribuzione e severità delle lesioni. Come ricordato in precedenza, nel 2004 sono stati proposti da Graus et al., dei criteri per la diagnosi di SNP [129]. Per la diagnosi di Encefalomielite viene raccomandato che siano presenti segni di disfunzioni di aree multiple del sistema nervoso centrale includendo i gangli dorsali dei nervi spinali ed il plesso mienterico. Tuttavia si raccomanda anche di non utilizzare tale

termine se c'è evidenza d'interessamento principale ad un singolo livello. In accordo con tale definizione tra i pazienti con ELP "plus" 21 sono stati classificati come affetti da EMP. Ci siamo quindi chiesti se questi pazienti differissero dagli altri pazienti con encefalite limbica "plus" per altro che non fosse il dato clinico di un prevalere della sintomatologia limbica sugli altri sintomi. Si è che i due gruppi differivano per età essendo i pazienti con ELP "plus" mediamente più giovani rispetto ai pazienti con EMP in misura statisticamente significativa inferiore ($p=0.0221$), mentre non si sono evidenziate differenze significative nel rapporto maschi e femmine sebbene questo fosse inferiore nella EMP (1.3M:1F) che nella EL "plus" in cui il rapporto era a favore dei maschi (1.8M:1F). La sintomatologia clinica dell'encefalite limbica è stata dominata in entrambi i gruppi dal deficit di memoria che si è riscontrato nell'85.7% delle EMP e nel 75% delle ELP "plus". Sotto il profilo clinico come ci si aspettava, non si sono riscontrate differenze statisticamente significative nei due gruppi. Si è inoltre osservato che nel gruppo "plus" i sintomi più frequentemente associati riguardavano il sistema autonomico (7 casi) o erano sintomi non codificati nell'ambito delle sindromi neurologiche paraneoplastiche definite "classiche" secondo i criteri di Graus. Dai dati di letteratura su casistiche di pazienti con encefalite associata ad anticorpi anti-Ma2 od anti-NMDAR appare evidente che i segni di interessamento del sistema limbico si associno al coinvolgimento di altre aree tra cui soprattutto il tronco encefalico ed il diencefalo, ma a questi non vengono classificati come affetti da EMP che viene più comunemente associato alla encefalite con anticorpi anti-Hu [11, 46, 77]. Nella nostra casistica gli anticorpi anti-Hu sono stati gli anticorpi riscontrati con maggiore frequenza in entrambi i gruppi tuttavia si sono trovati in maniera statisticamente significativa più frequentemente nei pazienti con EMP che con ELP "plus" ($p=0.0272$). Si può ipotizzare che il riscontro di anticorpi anti-Hu, in presenza di un quadro di interessamento neurologico multifocale, abbiano spinto a porre diagnosi di EMP, non essendo stata riscontrata tale differenza quando si sono analizzati i casi di ELP "pura" versus "plus". Anticorpi anti-Ma2 si sono riscontrati solo nell'ELP "plus" ($p=0.0024$). Questi anticorpi, come detto in precedenza, non sono generalmente considerati associati ad EMP, ma è noto che pazienti con anti-Ma2 possano presentarsi con segni di disfunzione anche a sede extralimbica e principalmente a livello del tronco encefalico e del diencefalo come riportato da Dalmau et al. [46]. Sembra quindi che la diagnosi sia stata guidata più dal tipo di anticorpo associato che dal quadro clinico. Dovrà quindi essere definito se si debba descrivere la sindrome sotto il profilo clinico e in termine di sede preferenzialmente colpita o se ci si debba spostare verso una definizione di patologia su base anticorpale e si debba quindi

parlare di “sindrome da Hu” e/o di “sindrome da anti-Ma” etc. Sotto il profilo oncologico il tumore più frequentemente associato ad entrambe le forme è risultato lo SCLC tuttavia questo è stato diagnosticato in maniera statisticamente significativa più frequentemente nei pazienti con EMP che nei pazienti con ELP “plus” ($p=0.0111$). Si conferma quindi anche nel nostro studio la stretta associazione fra EMP, anticorpi anti-Hu e SCLC [11]. Nella nostra casistica i pazienti con EMP presentavano in media un contenuto cellulare e un contenuto proteico maggiore rispetto ai pazienti con ELP “plus” sebbene la differenza non sia risultata statisticamente significativa. Inoltre i pazienti con EMP avevano una RNM encefalica in maniera statisticamente significativa ($p=0.0203$) più patologica di quelli con ELP “plus”. Inoltre nei pazienti con EMP si sono riscontrate maggiori alterazioni nelle sequenze pesate in T1 e con riscontro di acquisizione di mezzo di contrasto che potrebbero predire una maggiore probabilità di evoluzione ad atrofia. Nei pazienti analizzati non erano disponibili immagini seriate di RNM per valutare tale possibile evoluzione che viene tuttavia suggerita anche dai dati di letteratura [32]. Dall’analisi dell’outcome dei due gruppi considerando tutte le cause di morte i pazienti con ELP “plus” hanno mortalità più precoce, ma complessivamente i pazienti con EMP hanno una sopravvivenza peggiore dovuta e le differenze sono statisticamente significative (Log-rank test: $p=0.0162$). A spiegare tale differenza è la mortalità per causa della sindrome neurologica. Nella curva della mortalità per sindrome neurologica è mantenuta, infatti la stessa differenza (Log-Rank test $p=0.0160$) che non risulta significativa se consideriamo la morte per tumore (figura 29). I pazienti con EMP sembrano avere quindi una malattia neurologica più aggressiva come già riportato in letteratura [11, 35]. Se consideriamo tuttavia come indice di aggressività il tempo che intercorre dall’esordio dei sintomi neurologici al decesso non si riscontrano differenze nei due gruppi (9.7 mesi in entrambi i gruppi). Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative nemmeno per le alterazioni liquorali ($p=0.2008$ t. Fisher) o per la risposta alla terapia immunologica ($p=0.4100$), mentre risultano esserci differenze significative per la presenza di alterazioni alla RNM encefalica ($p=0.0203$). Un maggiore carico lesionale cerebrale potrebbe quindi correlare con la prognosi nei pazienti con EMP

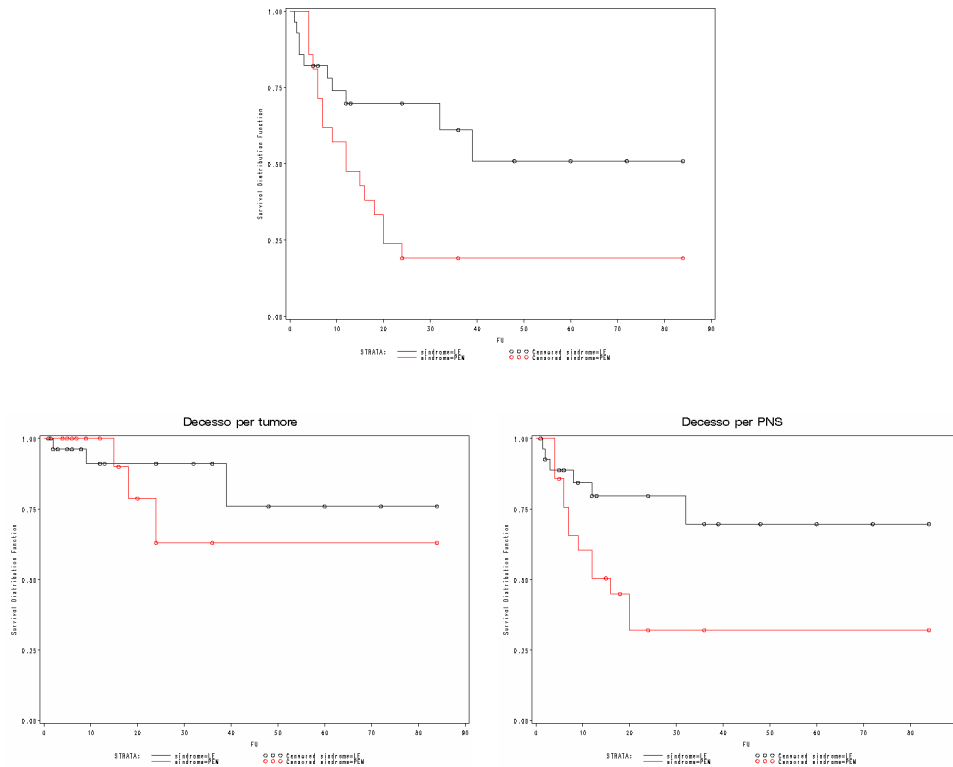


Figura n.29. Vengono riportate le curve di sopravvivenza dei pazienti con ELP “plus” (rossa) e EMP (nera) suddivise anche per causa di morte

ENCEFALITE LIMBICA ED ANTICORPI ANTI-NEURONE

Anticorpi anti neurone sono stati riscontrati nell’87.5% dei nostri pazienti, in percentuale quindi superiore rispetto alle casistiche precedenti in cui erano riportati valori pari al 60%. Tale differenza potrebbe essere spiegata da un bias di selezione dei pazienti, potendo essere, infatti, stati inseriti nel database preferenzialmente soggetti con positività per anticorpi anti-neurone. Di seguito sono discusse le caratteristiche della nostra casistica in relazione alla presenza di un particolare tipo di anticorpo.

ENCEFALITE LIMBICA ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-HU

Gli anticorpi anti-Hu si riscontrano in pazienti che possono avere segni e/o sintomi di coinvolgimento di qualsiasi parte del sistema nervoso. È anche comunemente riportato che circa 1/5 dei pazienti con EMP presenta all’esordio un’encefalite limbica e tuttavia questa raramente si riscontra in pazienti che siano esorditi con altre sindromi [135]. In due serie sulle caratteristiche dei pazienti con anticorpi anti-Hu, l’8-9% dei pazienti presentava un quadro di encefalite limbica come sintomo d’esordio, ma non è riportato, in nessuna delle due serie in

che Percentuale questi pazienti abbiano anche coinvolgimento di altre aree [10,11]. Nella serie di Gultekin et al., il 36% dei pazienti aveva anticorpi anti-Hu ed il 78% di questi mostrava segni di interessamento anche di altre aree del SN [35]. Nel nostro studio anticorpi anti-Hu sono stati riscontrati nel 49% dei casi in una percentuale non lontana da quella riportata da Gultekin et al., tuttavia nella nostra casistica solo la metà dei pazienti aveva segni d'interessamento di altre aree del sistema nervoso. Dai nostri dati quindi la presenza di anticorpi anti-Hu da una circa uguale probabilità di avere altre zone del SN centrale coinvolte. L'età media dei pazienti della nostra serie era in accordo con le precedenti casistiche (superiore ai 60 anni). Diversamente dalla casistica di Gultekin et al.[35], e di Luchinetti et al.[10], ma in accordo con lo studio di Graus et al.[11], si è riscontrata una prevalenza di soggetti di sesso maschile. Non ci sono in letteratura studi che focalizzino l'attenzione sulle caratteristiche dell'encefalite limbica associata ad anticorpi anti-Hu. Il nostro pertanto è il primo studio a focalizzare l'attenzione su questo aspetto. Luchinetti et al.,[10] riportano che tutti i pazienti con encefalite limbica, del loro studio, presentavano un deficit cognitivo e che meno del 60% aveva crisi epilettiche. Nel nostro studio abbiamo osservato la presenza di alterazioni cognitive nel 78% dei casi, mentre crisi epilettiche sono state riportate nel 41% dei casi. Come già riportato in letteratura, la neoplasia più frequentemente anche nella nostra serie era lo SCLC (74%). Nel nostro studio il 10.8% dei pazienti con anticorpi anti-Hu non aveva tumore (5/46), mentre l'incidenza dei pazienti con ELP e anticorpi anti-Hu in assenza di tumore non è nota. Nello studio di Gultekin et al. [35], solo un paziente non aveva tumore, ma non sono stati riportati dati di follow up di questo paziente. Per contro nello studio di Graus et al.[11], solo 4 pazienti (2%) non hanno sviluppato un tumore ad un follow up superiore a 4 anni, ma nessuno di questi 4 pazienti aveva un quadro di encefalite limbica (si trattava di 3 pazienti con neuronopatia sensitiva ed un paziente con degenerazione cerebellare) ed è quindi possibile che vi sia stata una maggiore sopravvivenza in questi pazienti legata al tipo di malattia neurologica. Nel nostro studio solo uno dei pazienti senza tumore è ancora vivo ma il follow up è ancora troppo breve per cui l'identificazione futura di una neoplasia non è escludibile con certezza. Nella nostra serie un liquor alterato è stato riscontrato nel 67% dei casi con anticorpi anti Hu in percentuale quindi inferiore all'88% descritto da Gultekin et al. Inoltre la presenza di alterazioni liquorali non erano correlate in maniera significativa all'andamento clinico della malattia, in particolare non si è dimostrata una correlazione significativa fra liquor patologico e decesso per sindrome neurologica. Il 57% dei pazienti è

deceduto e la principale causa di morte come riportato in letteratura è stata la progressione della sindrome neurologica (62% dei casi).

ENCEFALITE LIMBICA ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-MA2

Lo studio di Gultekin et al., è l'unico presente in letteratura che valuti la presenza degli anticorpi anti-Ma2 in un gruppo di pazienti con encefalite limbica e riporta una frequenza di tali anticorpi pari al 20% . tale percentuale viene confermata anche nel nostro studio dove gli anticorpi anti-Ma2 sono stati riscontrati nel 21% dei casi. A differenza della casistica di Gultekin il 27% dei pazienti erano di sesso femminile. Tuttavia pazienti di sesso femminile con ELP e anticorpi anti-Ma2 sono stati riportati in letteratura associati al tumore alla mammella, NSCLC e linfoma non Hodgkin [45,136]. Nella nostra casistica le pazienti presentavano in un caso un tumore della mammella, in 2 casi un NSCLC ed in un caso un NHL. Nelle altre due pazienti non è stata riconosciuta alcuna neoplasia. Un quadro di encefalite limbica classica è riportato da Dalmau et al. [46] nel 20% dei pazienti con anticorpi anti-Ma2 mentre nel nostro gruppo di pazienti il 55% aveva un quadro di encefalite limbica isolata. Bien et al. [137], descrivono nella loro casistica casi di encefalite limbica che si presentarono con un'epilessia di origine temporale. Tuttavia a nostra conoscenza c'è un solo caso riportato in letteratura di encefalite limbica che si presenta come epilessia farmaco-resistente associata ad anticorpi anti-Ma2 che richiede un approccio chirurgico per il controllo delle crisi [138]. Nel nostro gruppo sono riportati altri due casi. Si vuole pertanto sottolineare come una epilessia farmaco resistente possa essere una possibile manifestazione dell'ELP anche associata ad anticorpi anti-Ma2.

Il 45% dei nostri pazienti aveva anche segni d'interessamento extralimbico, con coinvolgimento del tronco encefalico (15%) le cui manifestazioni cliniche interessavano soprattutto la motilità oculare, come riportato da Dalmau et al. [46], seguiti dal coinvolgimento del cervelletto (10%). In due casi si è riscontrata la presenza di una neuropatia periferica, si riscontra quindi anche nella nostra casistica, come in quella riportata da Hoffman et al.[48], la possibilità che il quadro clinico associato ad anticorpi anti-Ma2 veda coinvolto anche il sistema nervoso periferico. In un nostro paziente è stato inoltre riportato anche il coinvolgimento del plesso mienterico con lo sviluppo di una sindrome da pseudoosturazione intestinale cronica, non segnalata in precedenza. La sintomatologia clinica associata agli anticorpi anti-Ma2 sembra quindi, anche grazie alla nostra casistica, essere più ampia di quanto fino ad ora ipotizzato. L'esame di RNM encefalica era patologico nel 76% dei casi in

percentuale simile a quella riportata in una casistica su 38 pazienti con anticorpi anti-Ma2 (74%) dove venivano però inclusi anche pazienti con sintomatologia solo extra limbica, mentre è risultata inferiore rispetto alla casistica di Gultekin dove il 90% dei pazienti aveva una RNM patologica. Non è stata dimostrata nel nostro studio, diversamente da quello di Dalmau et al. [46] l'esistenza di una correlazione tra alterazioni alla RNM encefalica e manifestazioni extralimbiche.

L'esame del liquor dei nostri pazienti è risultato alterato nel 57% dei casi, in percentuale di molto inferiore rispetto all'80% riscontrato da Gultekin et al.[35]. Il 30% dei nostri pazienti analogamente a quanto riportato da Gultekin ha presentato un miglioramento clinico.

ENCEFALITE LIMBICA ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-RI

Gli anticorpi anti-Ri sono stati riscontrati generalmente in pazienti con quadro a esordio subacuto caratterizzato principalmente da Opsoclono, mioclono e atassia in associazione preferenzialmente a tumori della mammella o del polmone (SCLC). Altre neoplasie talora correlate interessano l'apparato ginecologico e la vescica [99,100]. Nel database dello PNS-Euronetwork sono stati inclusi 43 pazienti con anticorpi anti-Ri. Il quadro neurologico riscontrato era caratterizzato da: Opsoclono mioclono (n=5) Encefalite del tronco (n=15), Degenerazione cerebellare (n=6), Encefalite limbica (n=4), Encefalomielite (n=1), Disautonomia (n=3), Sindrome della persona rigida (n=1), Neuronopatia sensitiva motoria (n=1), Neuronopatia sensitiva (n=6) e altre sindromi (n=7). La sintomatologia neurologica, possibilmente associata alla presenza di anticorpi anti-Ri, sembra pertanto, più ampia di quanto già riportato in letteratura. In particolare se consideriamo l'encefalite limbica abbiamo osservato che il 9% dei pazienti con anticorpi anti-Ri hanno tale patologia uno dei quali è stato pubblicato come caso clinico da alcuni partecipanti al PNS-Euronetwork [139]. Considerando quindi i nostri casi e quelli riportati in letteratura si possono delineare, seppure limitatamente alla piccola dimensione del campione, le caratteristiche dell' ELP associata ad anticorpi anti-Ri (tabella n.20). Questa sembra non avere una sostanziale preferenza per un sesso (3M:2F), interessa soggetti di media età (range 49-81). Con un quadro clinico caratterizzato soprattutto da alterazioni della memoria (5/5), stato confusionale (2/5) ed alterazioni della personalità (2/5). La presenza di crisi epilettiche è stata descritta solo nel nostro studio. Nel 60% dei pazienti sono evidenti sintomi che si estendono oltre alle aree limbiche. La sindrome neurologica predata la diagnosi del tumore nella maggior parte dei casi

(3/5) o predice una ripresa di malattia oncologica (1/6). In un caso non è stata riscontrata ad ora la presenza di tumore ad un follow up di oltre 4 anni. Non si è riscontrato un tumore preferenzialmente associato. L'esame liquorale è risultato alterato in tre su quattro casi per cui l'informazione era disponibile (contenuto cellulare medio di 14.75 cellule/mm³ e contenuto proteico medio 112 mg/dl). Mentre la RNM encefalica ha dimostrato la presenza di alterazioni temporali mesiali nelle sequenze a TR lungo in 4/5 pazienti e in 2 casi si è evidenziata anche la presenza di alterazioni T1 (iposegnale) con presa di contrasto. Nessuno dei pazienti sembra però, avere risposto al trattamento del tumore. Questo in associazione al fatto che un paziente ha un quadro neurologico stabile a 7 anni di follow up in assenza di riconoscimento del tumore potrebbe mettere in discussione la possibile esistenza di una correlazione causale fra i tumori riscontrati e l'encefalite associata ad anticorpi anti-Ri. Tuttavia nel caso di Harloff et al il quadro clinico ha preceduto il riconoscimento di una progressione di una neoplasia in remissione da 10 anni. Per avere conferma che le neoplasie riconosciute sono effettivamente associate alla SN dovremmo valutare l'espressione anticorpale sul tumore. La mancanza di quest'ultimo ha impedito di eseguire tale verifica. Va sottolineato inoltre che 3 dei 4 nostri pazienti hanno tratto beneficio dal trattamento con farmaci immunomodulatori (un caso con ciclofosfamide e due casi con steroidi). Dall'insieme delle informazioni derivanti dall'esame del liquor, della RNM encefalica e dalla risposta alla terapia immunomodulatoria sembra che l'encefalite da anticorpi anti-Ri abbia una forte componente immunitaria attiva.

Tabella n.20. **Encefalite limbica associata ad anticorpi anti-Ri**

| | Nostra casistica | Harloff et al. [139] | Launay et al[140] |
|--|--|--|--------------------------|
| Sesso | 1M e 2F | 1M | 1M |
| Età | 62 anni (range 56-81) | 68 | 49 |
| Deficit di memoria | 3 | 1 | - |
| Alterazioni della Personalità | 0 | 1 | 1 |
| Crisi epilettiche | 2 | - | - |
| Altri sintomi | Preudosostruzione intestinale cronica (1 caso) | Ipopituitarismo, emiparesi e paralisi oculomotoria | Aprassia |
| Tumore associato | 3 | 1 | 1 |
| Seminoma | 1 testicolare | | 1 mediastinico |
| NSCLC | 1 | 1 (carcinoide) | |
| Metastasi da primitivo a sede non nota | 1 | | |
| Liquor patologico | 3 | - | No |
| Alterazioni ippocampali alla RNM encefalica | 2 | 1 | No |
| Trattamento con farmaci immunomodulatori (risposta al trattamento) | 3(3) | 1 | No |
| Risposta al trattamento del tumore | No | No | No |
| Outcome: decesso Per PNS | 0 | 1 | 1 |
| decesso Per tumore | 2 | | |
| stabilizzazione | | | |

ENCEFALITE LIMBICA ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-AMFIFISINA

Gli anticorpi anti amfifisina sono più frequentemente riconosciuti associati a sindrome della persona rigida o a quadri di mielopatia, mentre raramente sono stati riscontrati in associazione a encefalite limbica. Da una revisione dei dati di letteratura emerge che 23 pazienti avevano un quadro compatibile con encefalite limbica, ma informazioni dettagliate sono disponibili solo per un paziente [37]. Nella casistica più ampia riportata da Pittok et al.[17], vengono descritte le caratteristiche generali dei pazienti, ma non riescono ad estrapolare le caratteristiche del liquor, della RNM encefalica e dell'outcome del sottogruppo di pazienti con encefalite. Da notare che la maggior parte di questi pazienti inoltre aveva anche altri anticorpi agli anti-amfifisina. La nostra pertanto è la prima casistica che riporta dettagliatamente le caratteristiche dei pazienti con encefalite limbica e anticorpi anti-amfifisina. Dalla nostra casistica si evince che i pazienti sono preferenzialmente maschi di età

superiore ai 60 anni. Il quadro neurologico può presentarsi in egual misura in forma pura o con sintomatologia aggiuntiva. Il liquor e la RNM encefalica sono in genere patologici. Il tumore preferenzialmente associato è lo SCLC o il tumore della mammella e la prognosi è in genere nefasta con decesso preferenzialmente determinato dalla sintomatologia neurologica. Anche nel caso degli anticorpi anti-amfifisina è possibile delineare la presenza di una encefalite associata le cui caratteristiche non sono però molto diverse da quelle che presentano i pazienti con anticorpi anti-Hu. Questo va a maggior ragione ricordato in quanto, le due reattività possono coesistere. In tabella n.21 sono confrontate le caratteristiche della nostra casistica con quelle dei casi riportati in letteratura.

Tabella n.21. Caratteristiche dei pazienti con ELP ed anticorpi anti-amfifisina. Confronto con i dati di letteratura.

| | Nostra casistica | Antoine et al. [14] | Saiz et al. [16] | Pittok et al. [17] | Dorresteijn et al. [37] |
|---|---------------------------------|----------------------------|-------------------------|--|--------------------------------|
| Numero di casi | 4 | 1 | 2 | 19 | 1 |
| Sesso | 3M/1F | M | 2M | 8M/11F | F |
| Età | 72 (media) | 55 | 58,71 | N/A | 63 |
| Deficit di memoria | 4 | 1 | N/A | N/A | 1 |
| Sintomi psichiatrici | 3 | 1 | N/A | N/A | 1 |
| Crisi epilettiche | 2 | - | N/A | 1 | 1 |
| Altri sintomi | 2 | - | 2 | 16 | |
| Altri anticorpi | No | 1 | 2 | 12 | |
| Tumore associato | SCLC 1 NSCLC 1 Mammella 1 | SCLC | SCLC 2 | 9 SCLC, 2 polmone, 1 mammella, 1 leiomioma, | SCLC |
| Liquor patologico | 2 | - | N/A | N/A | 1 |
| Alterazioni ippocampali alla RNM encefalica | 3 | 1 | N/A | N/A | - |
| Trattamento con farmaci immunomodulatori (risposta al trattamento) | 2(0) | N/A | N/A | N/A | - |
| Risposta al trattamento del tumore | 0 | N/A | N/A | N/A | 1 |
| Outcome: miglioramento decesso Per PNS decesso Per tumore stabilizzazione | 3 1 | N/A | N/A | N/A | 1 |

N/A= informazione non disponibile.

ENCEFALITE LIMBICA ED ANTICORPI ANTI-CV2

Gli anticorpi anti-CV2 possono associarsi ad una varietà di sindromi neurologiche paraneoplastiche anche se si è dimostrata una associazione preferenziale con neurite ottica e disordini del movimento di tipo percinetico [50, 141]. Tra i possibili sintomi neurologici associati ad anticorpi anti-CV2 viene riportata anche l'encefalite limbica. In una serie di 116 pazienti con anticorpi anti-CRMP5 il 40% aveva un quadro di encefalite e in particolare: demenza (25%), alterazioni della personalità (9%), crisi epilettiche (9%), depressione (7%), confusione (7%) e psicosi (3%) [20]. Tuttavia in questa serie non è descritto se i pazienti presentassero altri sintomi associati né sono riportate le caratteristiche oncologiche, di RNM encefalica e dell'esame del liquor dei singoli casi per cui non si possono trarre delle conclusioni su questo sottogruppo di pazienti. In un'altra serie di 16 pazienti con anticorpi anti-CRMP5 e problemi visivi un quadro di deterioramento cognitivo e/o crisi epilettiche è stato riconosciuto in 4 casi in nessuno di questi gli anticorpi anti-CRMP5 erano però gli unici presenti [141]. In altre quattro pubblicazioni sono stati riportati dettagliatamente i casi di ELP associata ad anticorpi anti-CV2 e questi sono stati confrontati con la nostra casistica. Dal confronto emerge che l'ELP associata ad anticorpi anti-CV2 non è molto frequente non vi è una sostanziale preferenza per sesso e colpisce in genere l'età media. Le neoplasie più frequentemente associate sono lo SCLC e il timoma. Il liquor e la RNM encefalica sono in genere patologiche. Si riscontra, nel 27% dei casi, un miglioramento della sindrome neurologica con il trattamento del tumore.

Si vuole inoltre sottolineare che in nessuno dei casi con ELP ed anticorpi anti-CV2 è stata identificata la presenza di movimenti discinetici. Tuttavia nel database sono raccolti 12 casi con corea la maggior parte dei quali ha anticorpi anti-CV2.

Tabella n.22. **Encefalite limbica e anticorpi anti-CV2/CRMP5. Confronto con i dati di letteratura.**

| | Nostra casistica | Antoine et al [142] | Honorat et al[143] | Rogemond V et al [110] | Kellinghaus et al [45] |
|---|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Numero di casi | 3 | 1 | 3 | 3 | 1 |
| Sesso | 1M/2F | F | 2M/1F | 2M/1F | M |
| Età media | 58.7 | 58 | 62 | 56 | 40 |
| Deficit di memoria | 2 | 1 | 3 | N/A | - |
| Sintomi psichiatrici | 2 | 1 | - | N/A | 1 |
| Crisi epilettiche | 1 | - | 3 | N/A | 1 |
| Altri sintomi | 1 | - | - | 1 | 1 |
| Altri anticorpi | No | - | - | - | - |
| Tumore associato | SCLC 1 Timoma 1 Mammella1 | Timoma | SCLC 2 Timoma1 | SCLC 2 Timoma1 | Testicular |
| Liquor patologico | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| Alterazioni ippocampali alla RNM encefalica | 2 | 1 | 2 | N/A | - |
| Trattamento con farmaci immunomodulatori (risposta al trattamento) | 2(1) | - | N/A | N/A | 1(1) |
| Risposta al trattamento del tumore | 1 | 1 | N/A | N/A | 1 |
| Outcome: miglioramento decesso Per PNS decesso Per tumore stabilizzazione | 1 2 | 1 | N/A | N/A | 1 |

N/A= informazione non disponibile.

ENCEFALITE LIMBICA ED ANTICORPI ANTI-TR

Gli anticorpi anti-Tr sono generalmente riconosciuti in pazienti con sindrome cerebellare associata a linfoma di Hodgkin. In una serie di 28 pazienti con questi anticorpi è stato riportato un solo caso di possibile encefalite limbica [144]. Tuttavia l'associazione fra linfoma di Hodgkin ed encefalite limbica non è infrequente e nella maggior parte di questi casi non viene riportato un autoanticorpo associato [35, 145-147]. È pertanto probabile che la frequenza della presenza degli anticorpi anti-Tr sia sottostimata. A parziale supporto di quest'affermazione sta anche il fatto che nel PNS-Database gli anticorpi anti-Tr sono stati riconosciuti solo in 11 casi/917 (2%) ed in tutti i casi, tranne uno, in associazione ad una DCP con associato un LH in 7 casi e un NHL in 2 casi. L'unico paziente con anticorpi anti-Tr non

associati alla presenza di una DCP era il caso riportato in questo lavoro. Si sottolinea quindi l'importanza della ricerca anche di questo tipo di anticorpi nei pazienti con encefalite limbica anche se RNM encefalica e liquor negativi come nel caso da noi riportato.

ENCEFALITE LIMBICA ED ANTICORPI ANTI-VGKC

La presenza di anticorpi anti-VGKC in pazienti con encefalite limbica viene sempre più frequentemente riportata. Nella maggior parte dei casi questa ha una patogenesi autoimmune non paraneoplastica. Tuttavia da una revisione dei dati di letteratura si evince che tra il 25 ed il 30% dei pazienti con encefalite limbica ed anticorpi anti-VGKC ha una neoplasia associata, più frequentemente un tumore del timo od uno SCLC anche se altre neoplasie sono state riportate quali tumore della mammella, prostata etc. Nella nostra casistica gli anticorpi anti-VGKC sono stati riscontrati in soli 2 casi; configurando quindi il 2% dei casi di ELP. In entrambi i casi (recentemente pubblicati, Zuliani L et al.[69]) è stata dimostrata una associazione con anticorpi anti-AGNA. Gli anticorpi anti-AGNA, il cui antigene è stato recentemente identificato essere SOX1, sembrano essere strettamente legati alla presenza di neoplasia polmonare in pazienti con sindromi neurologiche associate alla presenza di anticorpi anti canali ionici. Infatti, sono stati identificati, oltre che in questi due casi, anche in casi di LEMS con SCLC e anticorpi anti-VGCC. È possibile quindi che esistano dei marcatori Per l'identificazione delle forme paraneoplastiche associate a canali ionici. L'identificazione di questi ultimi è particolarmente importante se consideriamo che la maggior parte di queste forme non ha una origine paraneoplastica e che nelle forme paraneoplastiche la neoplasia associata non è spesso di facile identificazione. Questi marcatori potrebbero pertanto essere da un lato utili Per identificare i 25-30% dei pazienti che richiedono un attento follow up anche oncologico. Da un confronto dei nostri casi e di quelli riportati in letteratura (tabella n.23) emerge che i pazienti con ELP associata ad anti-VGKC non differiscono sotto il profilo clinico dai pazienti con ELP associata ad altri anticorpi se non per un più frequente riscontro di un andamento clinico di tipo recidivante remittente e una più frequente risposta a trattamenti che interferiscono con la risposta immunitaria anticorpo mediata (PA, IvIg, steroidi).

Tabella 23. Caratteristiche cliniche dei pazienti con ELP associata ad anticorpi anti-VGKC: confronto con i dati di letteratura

| | Clinica | Numero di casi | RNM | Liquor | Tumore | Terapia | Outcome |
|---------------------------|----------------|-----------------------|---|--|---|-----------------------|----------------|
| Lee EK et al [57] | SM | 1 | Normale | Normale | Timoma | PA steroidi | MP |
| Bukley C et al, [64] | LE + DS+ MG | 1 | Normale | Normale | Timoma | PA | RC |
| Liguori R et al, 1[59] | SM | 1 | I Perintensità di segnale correlate all'età | Normale | NSCLC | PA | RR |
| Pozo-Roscih P et al, [65] | LE | 2 | NS | NS | SCLC (1), polmone non istologia (1) | IVIg, IVIg e Steroidi | RR (1) NM (1) |
| Thieben MJ et al, [66] | LE | 1 | Tipica | NS | Adenocarcinoma della prostata | Steroidi | MP |
| Ohshita T et al, [67] | LE | 1 | Tipica + insula+ corteccia frontobasale | Cellule normali, Protene 60 mg/dL | Timoma | No | RR |
| Battaller L. et al, [148] | LE | 1 | Tipica | NS | Adenocarcinoma della prostata | NS | NS |
| Zuliani et al, 2008[69] | LE | 2 | Tipica (1) e Normale (1) | 20 GB/mm ³ (1) e normale (1) | SCLC (2) | Steroidi (1) | RR(1), NM (1) |
| Jacob S, [62] | LE, I, DN | 1 | Normale | NS | Timoma | IVIg, AZ | RR |
| Seikiguchi Y et al, [61] | SM | 1 | Tipica + ipotalamo | 15 GB/mm ³ , proteine normali | Timoma | Steroidi | RR |
| Jarius S. et al, [68] | LE | 6 | NS | NS | SCLC (2), NSCLC (1), polmone non specificato (1), Mammella (1), Colon-Retto (1) | NS | NS |

SM= sindrome di Morvan; I= ipotermia; LE= encefalite limbica; DN= dolore neuropatico; DS= disautonomia (eccessiva sudorazione ed aumento delle secrezioni); MG= miastenia gravis; RNM Tipica= alterazioni lobi temporali mediali bilaterali; NS= non specificato; IVIg= immunoglobuline Per endovena; PA= plasmaferesi; AZ= azatioprina; RR= recidivante-remittente; MP= miglioramento parziale; RC= remissione completa.

ENCEFALITE LIMBICA ED ANTICORPI ANTI-VGCC

Anticorpi anti-VGCC sono stati identificati in pazienti con LEMS sia paraneoplastica che non paraneoplastica [70]. Tuttavia più recentemente è emerso che questi anticorpi possono associarsi anche a sintomi indicativi di un coinvolgimento del SNC ed in particolare alla DCP [71]. In letteratura viene riportata anche l'associazione tra anti-VGCC ed ELP ed a nostra conoscenza sono segnalati 11 casi. Nove casi descritti da Lawn et al [72]. In questo studio veniva segnalato che questi pazienti non avevano segni e/o sintomi di LEMS, che il quadro clinico non differiva da quello dei casi senza anticorpi anti-VGCC e che il tumore associato era in 6 casi lo SCLC, mentre negli altri tre casi presentavano rispettivamente un tumore della

mammella, uno NSCLC ed un timoma. Un altro caso viene descritto da Weimer et al ed era un paziente sottoposto a lobectomia temporale per stato di male epilettico in cui si riscontrava la presenza di uno SCLC [73]. Un ultimo caso è stato descritto da Maddison e Lang [149] in uno studio prospettico su 148 pazienti con SCLC. Le caratteristiche cliniche di questo caso non sono riportate. Nel PNS-Euronetwork database gli anticorpi anti-VGCC sono riportati in 36/917 pazienti (4%) di questi pazienti due hanno presentato anticorpi anti-VGCC associati a ELP, ma in un caso era presente anche una LEMS ed erano associati anticorpi anti-Hu per cui si è ritenuto che gli anti-VGCC fossero marcatori della LEMS piuttosto che della ELP. Nel secondo caso invece si trattava di un'ELP pura con associato uno SCLC. Si evidenzia così l'esistenza di un ulteriore sottogruppo di pazienti in cui il quadro di encefalite limbica si associa ad anticorpi anti-VGCC, che allarga lo spettro dei casi di encefalite limbica dovuti ad anticorpi diretti contro i canali ionici. Ci preme inoltre sottolineare che questi anticorpi non vengono comunemente ricercati nei casi di SNP tranne che nella LEMS e che quindi è possibile che la loro frequenza sia maggiore dell'attesa.

ENCEFALITE LIMBICA ED ANTICORPI ANTI NMDAR

Anticorpi anti-NMDAR sono stati solo di recente identificati ed ancora sono pochi i laboratori in grado di testare tale reattività. È pertanto possibile l'aver riscontrato solo 2 pazienti con ELP associata ad anticorpi anti-NMDAR sia un dato sottostimato e che alcuni dei pazienti senza anticorpi abbiano in realtà tale reattività. Nel gruppo senza anticorpi tuttavia non è stato riconosciuto nessun paziente con teratoma dell'ovaio, ma è possibile che il tumore che il tumore che ad oggi si pensa sia associato non sia in realtà quello causale. D'altra parte è anche possibile che questi pazienti non siano stati inseriti nel database perché il teratoma dell'ovaio è spesso benigno e quindi non identificato nelle indagini routinarie per la ricerca delle neoplasie associate alle sindromi neurologiche e che quindi molti di questi pazienti siano ad oggi stati ritenuti affetti da forme idiopatiche. Ci aspettiamo di avere un aumento considerevole di questo gruppo di pazienti nei prossimi anni, anche se l'ELP associata ad anticorpi anti-NMDAR sembra maggiormente frequente nella popolazione giapponese [74-79].

ENCEFALITE LIMBICA PARANEOPLASTICA NON ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI NEURONE.

In letteratura è riportato che il 40% dei pazienti con ELP non hanno anticorpi anti-neurone. Nel nostro studio il gruppo di pazienti senza anticorpi anti-neurone è risultato il terzo Per frequenza dopo il gruppo con anticorpi anti-Hu ed anti-Ma2. Tuttavia la percentuale di pazienti senza anticorpi era inferiore rispetto a quella della letteratura essendo pari al 12.5%. È possibile che nel tempo questa percentuale si riduca ulteriormente è che in questo gruppo siano individuate reattività fino ad ora non note. Le caratteristiche di questo gruppo di pazienti sono state confrontate con quelle dei pazienti con anticorpi anti-Hu e anti-Ma2 essendo queste le popolazioni campionarie più numerose. Sono state riscontrate differenze significative (tabella n. 24) per età, essendo i pazienti con ELP associata ad anticorpi anti Ma2 più giovani che negli altri gruppi ($P=0.023$; t. Wilcoxon), e per tumore associato, essendo il tumore del testicolo presente solo nei pazienti con anticorpi anti-Ma2 ($P<0.0001$; t. esatto di Fisher) e lo SCLC prevalente nei pazienti con anticorpi anti Hu ($P<0.0001$ t esatto di Fischer), mentre nei pazienti senza anticorpi predominano altri tumori senza che ve ne sia uno particolarmente associato. Inoltre, i pazienti con anticorpi anti-Ma2 ed senza anticorpi hanno mostrato maggiore risposta alla terapia del tumore rispetto ai pazienti con anti-Hu. Questi dati concordano con quelli riportati in letteratura da Gultekin et al. [35] e Dalmau et al [46]. La maggior risposta al trattamento del tumore nei pazienti senza anticorpi potrebbe essere almeno in parte un bias di selezione essendo i clinici più propensi a credere all'origine paraneoplastica della sindrome neurologica se questa risponde al trattamento del tumore. Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative invece in termini di caratteristiche cliniche, alterazioni liquorali ed alla RNM encefalica. Questo sta a indicare che le caratteristiche dell'encefalite limbica sono simili nei due gruppi, ma a differenza di quanto riportato da Gultekin et al.[35] nella nostra serie non si osserva una maggiore tendenza dei pazienti con anticorpi anti-Hu ad avere segni d'interessamento di altre aree del SN. Inoltre, non sono state messe in luce differenze statisticamente significative in termini di mortalità fra i diversi gruppi.(Figura n.29)

Tabella n.24 **Confronto fra ELP associata ad anticorpi anti-Hu, anti-Ma2 e senza anticorpi**

| | HU | Ma | No ab | Significatività |
|--------------------------------|-----------|-----------|--------------|---------------------------|
| Età media | 65.2 | 48.9 | 66.8 | <i>P= 0.023</i> |
| Sesso M/Fo | 33/18 | 16/6 | 10/3 | P=0.622 |
| Deficit di memoria | 78% | 72% | 76% | P=0.539 |
| Stato confusionale | 56.7% | 45.4% | 46% | P=0.596 |
| Sintomi psichiatrici | 23.5% | 31.8% | 23%3 | P=0.739 |
| Crisi epilettiche | 41.1% | 31.8% | 53% | P=0.437 |
| Altri sintomi | 50.9% | 45.5% | 38.4% | P=0.0701 |
| SCLC | 34 | 0 | 2 | <i>P<0.0001</i> |
| Testicolo | 0 | 10 | 0 | <i>P<0.0001</i> |
| Altri tumori | 12 | 8 | 10 | <i>P=0.003</i> |
| Liquor patologico | 75% | 58% | 70% | P=0.391 |
| MRI patologica | 77% | 76% | 69% | P=0.883 |
| Risposta al trattamento IM | 23% | 18% | 20% | P=0.942 |
| Risposta al trattamento tumore | 15.2% | 44% | 30% | <i>P=0.044</i> |

Per le analisi statistiche sono stati utilizzati il test esatto di Fisher ed il test di Wilcoxon nel confronto per età.

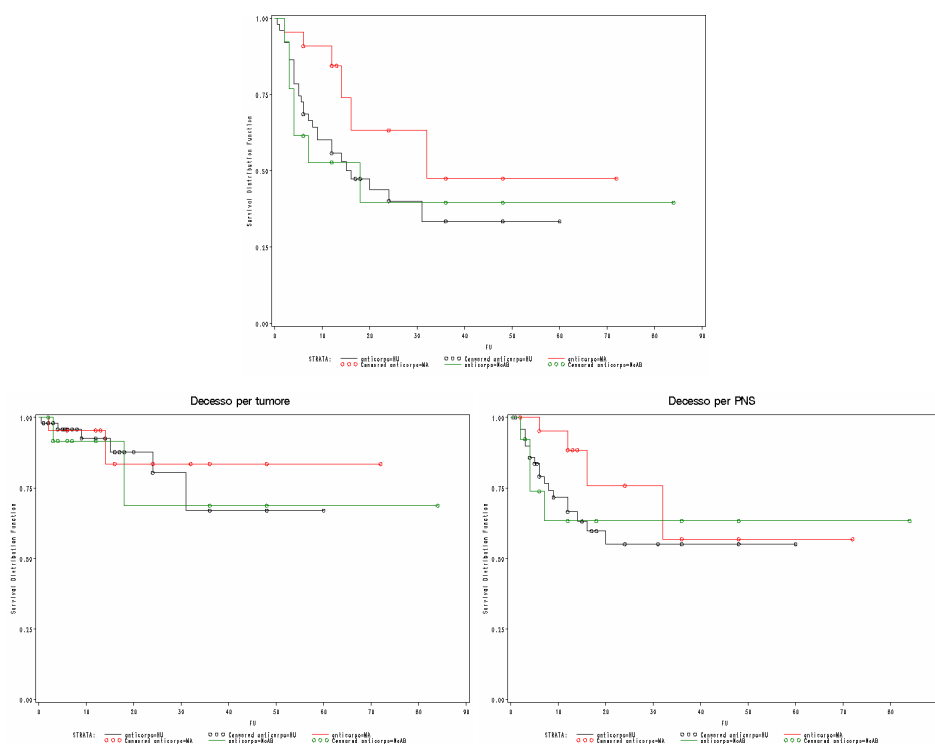


Figura n.29. Vengono riportate le curve di sopravvivenza dei pazienti con ELP associata ad anticorpi anti-Hu (nero), anti-Ma2 (rosso) ed senza anticorpi (verde) suddivise anche Per causa di morte

IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA REATTIVITÀ ANTICORPALE

Abbiamo riportato un caso di una paziente con un quadro di ELP con una reattività atipica presente sia nel siero che nel liquor. Grazie alla collaborazione con il laboratorio del Prof Dalmau J dell'Università di Pennsylvania (Philadelphia-USA) è stato possibile identificare l'antigene bersaglio dell'anticorpo riconosciuto nella sub unità GluR2 del recettore per il glutammato di tipo AMPA. Il recettore tipo AMPA (AMPA) è parte di una famiglia dei recettori ionotropici per il glutammato che è altamente conservata tra i mammiferi e che media gran parte della trasmissione eccitatoria a livello cerebrale [150]. La maggior parte dei recettori tipo AMPA sono eterotetrameri composti dalle sub unità GluR1, 2,3,4. Le diverse sub unità sono variabilmente espresse a livello dell'encefalo e a livello dell'ippocampo vi è una particolare espressione di questi recettori [151]. È possibile che gli anticorpi anti-AMPA interferiscano con i meccanismi di plasticità sinaptica a livello ippocampale interferendo pertanto con i processi di apprendimento e memoria e possano quindi essere responsabili dei deficit di memoria riscontrati nella paziente. La nostra paziente si presentava con un quadro di encefalite limbica che, come per alcuni casi di ELP associati ad anticorpi anti-VGKC, ha avuto un andamento di tipo recidivante-remittente ed ha dimostrato un'importante

responsività al trattamento immunomodulatorio soprattutto con steroidi. In questa paziente è stato riscontrato un tumore della mammella, purtroppo difficoltà nella conservazione del tessuto tumorale non ci hanno consentito di verificare se il tumore esprimesse recettori tipo AMPA. Si delinea quindi un nuovo gruppo di pazienti con encefalite limbica potenzialmente trattabile e nuovi casi potranno essere identificati fra i pazienti che al momento non hanno anticorpi associati.

CONCLUSIONI

Le SNP sono malattie rare per la maggiore comprensione delle quali sono necessari studi multicentrici. Grazie alla creazione di un database Europeo siamo riusciti a raccogliere in questo studio la più ampia casistica di pazienti con ELP mai riportata in letteratura. Le analisi condotte ci hanno permesso di affermare che:

1. I pazienti inseriti nel database Europeo per le SNP rispondono ai criteri di proposti da Graus et al., per la definizione di SNP. Tuttavia per il 24% dei pazienti non vengono rispettati i criteri proposti da Graus et al., per la definizione di encefalite limbica mancando in questi il dato relativo alla dimostrazione del coinvolgimento del sistema limbico con metodiche di neuro immagine o con dati patologici. Tuttavia riteniamo che questi criteri siano restrittivi in quanto, anche dai dati di letteratura almeno il 30% dei pazienti con ELP ha una RNM encefalica negativa, non in tutti i centri sono disponibili metodiche più sofisticate come la FDG-PET e l'approccio bioptico non è senza rischi per il paziente. A nostro parere è raccomandabile, ma non mandatoria, per definire un quadro di encefalite limbica, la dimostrazione mediante altre metodiche del coinvolgimento del sistema limbico qualora la RNM encefalica sia negativa. Questo elemento rappresenta pertanto uno spunto importante per una revisione dei criteri proposti da Graus et al.
2. Lo studio della nostra serie di pazienti mostra risultati simili a quelli di casistiche meno numerose. Tuttavia abbiamo riscontrato alcune differenze. Queste riguardano:
 - a. una predominanza del sesso maschile sul sesso femminile nei casi di ELP. Non sembra quindi dalla nostra serie che le donne abbiano una maggiore predisposizione allo sviluppo di SNP.
 - b. Una maggior caratterizzazione semeiotica dell'encefalite limbica. Infatti, la nostra è la prima serie in cui vengono descritti in maniera dettagliata i vari aspetti delle alterazioni neuropsicologiche e psichiatriche dei pazienti con encefalite limbica benché non abbiamo, per la maggior parte dei pazienti, test psicometrici per una quantificazione precisa di questi vari aspetti. Gli elementi

acquisiti ci consentono tuttavia di fornire nuovi spunti per studi futuri di approfondimento in queste tematiche.

3. Nella nostra serie come nei dati di letteratura i tumori più frequentemente associati all'ELP sono: lo SCLC (44%), il tumore del testicolo (9,6%) ed il tumore della mammella (5%). Va segnalato però che è emersa anche una nuova possibile associazione con il tumore gastrico che non era mai stata segnalata.
4. Circa la metà dei nostri pazienti può essere classificato come affetto da ELP di tipo "puro", mentre l'altra metà di tipo "plus" cioè presenta una sintomatologia clinica indicativa del coinvolgimento di altri distretti. Quando questi due gruppi sono stati messi a confronto non sono tuttavia emerse differenze statisticamente significative.
5. I pazienti con ELP di tipo plus possono a loro volta essere sotto stratificati in pazienti con ELP "plus" o EMP. Quando questi due gruppi sono stati messi a confronto sono emerse delle differenze significative per età, frequenza di associazione con lo SCLC, tipologia di anticorpo associato, alterazioni patologiche alla RNM encefalica e mortalità per SNP. Queste osservazioni confermano quanto è suggerito dai dati della letteratura, anche se non esiste alcun lavoro che confronti questi due gruppi di pazienti.
6. Nella nostra serie è stata riscontrata una più ampia positività per anticorpi anti-neurone di quanto precedentemente riportato. Come descritto in letteratura l'anticorpo più frequentemente associato all'ELP è l'anti-Hu. Tuttavia a differenza di quanto riportato in letteratura nei nostri casi non è stato dimostrato che questo gruppo di pazienti presenta una maggiore probabilità di avere un coinvolgimento di aree extralimbiche e non ha una maggiore mortalità. I pazienti con ELP associata ad anticorpi anti-Ma2 anche nel nostro studio sono preferenzialmente soggetti maschi giovani con associato tumore testicolare ed hanno una maggiore risposta alla terapia del tumore. Tuttavia nella nostra casistica non si riscontrano frequentemente segni d'interessamento delle strutture del tronco encefalico o del diencefalo ed i pazienti non hanno una minore mortalità di quelli con anti-Hu.
7. È possibile sotto classificare i pazienti con ELP per tipologia di anticorpo associato. Si sottolinea pertanto la tendenza degli ultimi studi a passare da una classificazione per

sintomatologia clinica ad una per tipo di anticorpo associato, anche in relazione a possibili implicazioni terapeutiche. Confrontando i nostri dati con quelli presenti in letteratura si possono ottenere alcune indicazioni di ausilio diagnostico:

- a. L'ELP associata ad anti-CV2 non è molto frequente. Non ha una sostanziale preferenza per sesso e colpisce in genere l'età media. Le neoplasie più frequentemente associate sono lo SCLC e il timoma. Il liquor e la RNM encefalica sono in genere patologiche e si riscontra, nel 27% dei casi, un miglioramento della sindrome neurologica con il trattamento del tumore.
- b. L'ELP associata ad anticorpi anti-amfifisina si ha in pazienti preferenzialmente maschi di età superiore ai 60 anni. Il quadro neurologico può presentarsi in egual misura in forma pura o con sintomatologia aggiuntiva. Il liquor e la RNM encefalica sono in genere patologici. Il tumore preferenzialmente associato è lo SCLC o il tumore della mammella e la prognosi è in genere nefasta con decesso preferenzialmente determinato dalla sintomatologia neurologica.
- c. ELP associata ad anticorpi anti-Ri. Questa sembra non avere una sostanziale preferenza per un sesso ed interessa soggetti di media età. Il quadro clinico è caratterizzato soprattutto da alterazioni della memoria. Nel 60% dei pazienti sono evidenti sintomi che si estendono oltre alle aree limbiche. Non si è riscontrato un tumore preferenzialmente associato. L'esame liquorale e la RNM encefalica sono generalmente alterate e sembra esserci una buona risposta alla terapia immunomodulatoria.
- d. ELP associata ad anticorpi anti-VGKC. Non si differenzia in maniera significativa dalle altre forme se non per un più frequente andamento recidivante-remittente ed una più frequente risposta al trattamento immunomodulatorio. Si sottolinea inoltre l'importanza di avere altri marcatori tipo gli anticorpi tipo AGNA per differenziare le forme paraneoplastiche dalle non paraneoplastiche.
- e. ELP può associarsi anche ad altre reattività anticorpali finora poco considerate. Sono stati infatti descritti casi di ELP associata ad anticorpi anti-VGCC ed

anti-Tr. Inoltre nella nostra casistica sono presenti solo due casi con anticorpi anti-NMDAR probabilmente per la caratterizzazione troppo recente di questi anticorpi che sono identificati solo in pochi centri.

8. Nel nostro studio è stata identificata una nuova reattività anticorpale diretta contro il recettore per il glutammato tipo AMPAR. Tale reattività si associa ad una ELP classica con andamento recidivante e remittente e buona risposta alla terapia immunomodulatoria. Si allarga così lo spettro delle possibili reattività associate all'ELP

BIBLIOGRAFIA

- [1] Posner JB. Paraneoplastic syndromes. In Posner JB (Ed), *Neurologic Complication of Cancer*. Philadelphia, PA: FA Davis Co; 1995 p-353-385.
- [2] Posner JB. Immunology of Paraneoplastic Syndromes. Overview. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 998:178-186.
- [3] Henson RA, Hoffman HL and Urich H. Encephalomyelitis with carcinoma. *Brain* 1965; 88:449-464.
- [4] Greenfield JG. Subacute spinocerebellar degeneration occurring in elderly patients. *Brain* 1934; 57: 161-176.
- [5] Henson RA, Russel DS, Wilkinson M. Carcinomatous neuropathy and myopathy. A clinic pathological study. *Brain* 1954; 77: 82-121.
- [6] Henson RA and Urich H. Encephalomyelitis with carcinoma. In Henson RA and Urich H (Eds), *Cancer and the Nervous System*. Oxford, Blackwell; 1982 p-314-345.
- [7] Denny-Brown D. Primary sensory neuropathy with muscular changes associated with carcinoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1948; 11:73-87
- [8] Graus F, Elkouf KB, Corda-Cardo C, Posner JB. Sensory Neuronopathy and small cell lung cancer. Anti neuronal antibody that also reacts with the tumor. *Am. J Med* 1986; 80:45-52.
- [9] Dalmau J, Graus J, Rosenblum MK, Posner J. Anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine* 1992; 71:59-72.
- [10] Luchinetti CF, Kimmel DW, Vanda AL. Paraneoplastic and oncologic profiles of patients seropositive for Type 1 antineuronal nuclear autoantibodies. *Neurology* 1998; 50:652-657.
- [11] Graus F, Keime-Guibert F, René R, Benyahia B, Ribalta T, Ascaso C, Escaramis G, Delattre JY. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 2001; 24:1138-1148.
- [12] Keime-Guibert F, Graus F, Fleury A, René R, Honnorat J, Broët P, Delattre JY. Treatment of paraneoplastic neurological syndrome with antineuronal antibodies (anti-Hu, anti-Yo) with a combination of immunoglobulins, cyclophosphamide and methylprednisone. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68: 479-482.

- [13] Dropcho EJ. Anti-amphiphysin antibodies with small cell lung carcinoma and paraneoplastic encephalomyelitis. *Ann Neurol* 1996; 39:659-667.
- [14] Antoine JC, Absi L, Honnorat J, Boulesteix JM, de Brouker T, Vial C, Butler M, De Camilli P, Michale D. Amphiphysin antibodies are associated with various paraneoplastic neurological syndromes and tumours. *Arch Neurol* 1999; 56:172-177.
- [15] Lennon VA, Manley HA, Kim KK, Parisi J, Kilimann MW, Bennarroch Eduardo E. Amphiphysin autoantibodies: a paraneoplastic serological marker of breast and lung cancer-related Encephalomyeloradiculoneuritis but not classical stiffman syndrome. *Neurology* 1997; 48 (suppl 2): A434.
- [16] Saiz A, Dalmau J, Butler MH, Chen Q, Delattre JY, De Camilli P, Graus F. Anti-amphiphysin I autoantibodies in patients with paraneoplastic neurological disorders associated with small cell lung carcinoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66:214-217.
- [17] Pittock SJ, Luchinetti CF, Parisi JE, Bennarroch EE, Mokri B, Stephan CL, Kim KK, Kilimann MW, Lennon VA. Amphiphysin autoimmunity: paraneoplastic accompaniments. *Ann Neurol* 2005; 58:96-107.
- [18] Antoine J, Honnorat J, Koeing F, Aguera M, Berlin MF, Michel D. Posterior uveitis and paraneoplastic encephalomyelitis with auto-antibodies reacting against cytoplasmic protein of brain and retina. *J Neurol Sci* 1993; 163: 159-162.
- [19] Vernino S, Tuite P, Adler CH, Meschia JF, Boeve BJ, Boasberg P, Parisi JE, Lennon V. Paraneoplastic corea associated with CRMP-5 neuronal antibody and lung carcinoma. *Ann Neurol* 2002; 51:625-630.
- [20] Yu Z, Kryzer TJ, Griesmann GE, Kim K, Bennarroch EE, Lennon VA. CRMP-5 Neuronal antibodies: marker of lung cancer and thymoma related autoimmunity. *Ann Neurol* 2001; 49:146-154.
- [21] Honnorat J, Cartalat-Cartel S, Ricard D, Camdessanchè JP, Carpentier AF, Rogemond V, Chapuis F, Aguera M, Decullier E, Duchemin AM, Graus F, Antoine JC. Onco-neural antibodies and tumor type determine survival and neurological symptoms in paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu or CV2/CRMP5. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;
- [22] Vernino S, Lennon VA. New Purkinje Cell Antibody (PCA-2): Marker of Lung Cancer-Related Neurological Autoimmunity. *Ann. Neurol.* 2000; 47: 297-305.
- [23] Chan KH, Vernino S, Lennon V. ANNA-3 Anti-Neuronal Neuronal Antibody: marker of Lung Cancer-Related Autoimmunity. *Ann Neurol* 2001; 50: 301-311.

- [24] Brierley JB, Corsellys JAN, Hierons R, Nevin S. Subacute encephalitis of later adult life mainly affecting the limbic areas. *Brain* 1960; 83:357-368.
- [25] Verhaart WJC. Gray matter degeneration of the CNS in carcinoma. *Acta Neuropathol (Berl)* 1961; 1:107-112.
- [26] Störing G, Hauss K, Ule G. Zur topischen Diagnostik des anamnestischen Symptomenkomplexes. *Psychiatr Neurol (Basel)* 1962; 143:161-177.
- [27] Yahr MD, Duvosin RC, Cowen D. Encephalopathy associated with carcinoma. *Trans Am Neurol Assoc* 1965; 90:80-86.
- [28] Ulrich J, Spiess H, Huber R. Neurological syndromes as a remote effect of a malignant tumor (Ammon's horn sclerosis in bronchial carcinoma). *Schweiz Arch Neurol Neurochir Psychiatrie* 1967;99:83-100.
- [29] Corsellis JAN, Goldberg GJ, Norton AR. Limbic encephalitis and its association with carcinoma". *Brain* 1968; 91: 481-496.
- [30] Koeler J, Hufschmidt A, Hermele L, Volk B, Luking CH. Limbic encephalitis: two cases. *J Neuroimmunol* 1988;10:177-178.
- [31] Sutton RC, Lipper MH, Brashear HR. Limbic encephalitis occurring in association with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56:808-811.
- [32] Dirr LY, Elster AD, Donofrio PD, Smith M. Evolution of brain MRI abnormalities in limbic encephalitis. *Neurology* 1990; 40:1304-1306.
- [33] Scheid R, Lincke T, Voltz R, von Cramond DY, Sabri O. Serial 18F-fluoro-2 deoxy-D-Glucose positron emission tomography and magnetic resonance imaging of paraneoplastic limbic encephalitis. *Arch Neurol* 2004; 61:1785-1789.
- [34] Ances B, Vitaliani R, Taylor RA, Liebeskind DS, Voloschin A, Houghton DJ, Galetta SL, Dichter M, Alavi A, Rosenfeld MR, Dalmau J. Neuropil Antibodies in treatment responsive limbic encephalitis: clinical, MRI and PFT correlates. *Brain* 2005; 128: 1764-1777.
- [35] Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, Eichen J, Posner JB, Dalmau J. Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings, and tumor association in 50 patients. *Brain* 2000; 123:1481-1494.
- [36] 7•]•n E, Dalmau J. Limbic encephalitis and variants: classification, diagnosis and treatment. *The Neurologist* 2007; 5:261-271.
- [37] Dorresteijn LD, Kappelle AC, Reiner WO, Gijtenbek JM. Anti-amphiphysin associated limbic encephalitis: a paraneoplastic presentation of small cell carcinoma. *J Neurol* 2002; 249: 1307-1308.

- [38] Harloff A, Hummel S, Kleinschmidt E, Rauer S. Anti-Ri antibodies and limbic encephalitis in a patient with carcinoid tumor of the lung. *J Neurol* 2005; 252:1404-1405.
- [39] Launay M, Bozzolo E, Venissac N, Delmont E, Freinrich A, Tomas P. Paraneoplastic limbic encephalitis with positive anti-Ri antibodies and mediastinal seminoma. *Rev Neurol (Paris)* 2008; 164:612-619.
- [40] Vernino S, Lennon VA. Autoantibody profiles and neurological correlations of thymoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7270-7275.
- [41] Saiz A, Blanco Y, Sabater L, González F, Battaler L, Casamitjana R, Ramió-Torrentà L, Graus F. Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. *Brain* 2008; 131: 2553-2563.
- [42] Sabater L, Gómez-Choco, Saiz A, Graus F. BRserine/threonine kinase 2: a new autoantigen in paraneoplastic limbic encephalitis. *J Neuroimmunol* 2005; 170:186-190.
- [43] Fadul CE, Stommel EW, Dragnev KH, Dalmau JO. Focal paraneoplastic limbic encephalitis presenting as orgasmic epilepsy. *J Neuro-Oncol* 2005; 72:195-198.
- [44] Voltz R, Gultekin SH, Rosenfeld MR, Gerstner E, Eichen J, Posner JB, Dalmau J. A serologic marker of paraneoplastic limbic and brainstem encephalitis in patients with testicular cancer. *N Engl J Med* 1999; 340(23):1773-1848.
- [45] Rosenfeld MR, Eichen J, Wade DF, Posner JP, Dalmau J. Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol* 2001; 50: 339-348.
- [46] Dalmau J, Graus F, Villarejo A, Posner JB, Blumenthal D, Thiessen B, Saiz A, Meneses P, Rosenfeld MR. Clinical analysis of anti-Ma2 associated encephalitis. *Brain* 2004; 127(8): 1831-1844.
- [47] Compta Y, Iranzo A, Santamaria J, Casamitjana R, Graus F. REM sleep behavior disorders and narcoleptic features in anti-Ma2 associated encephalitis. *Sleep* 2007; 30: 767-779.
- [48] Hoffmann LA, Jarius S, Pellkofer HL, Schuller M, Krumbholz M, Koenig F, Jöhrmann W, La Fougère C, Vincent A, Voltz R. Anti-Ma and anti-Ta associated paraneoplastic neurological syndromes: 22 newly diagnosed patients and review of previous cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 767-773.
- [49] Mathew RM, Vanderberghe R, Garcia-Merino A, Yamamoto T, Landolfi JC, Rosenfeld MR, Rossi JE, Thiessen B, Dropcho EJ, Dalmau J. Orchiectomy for suspected microscopic tumor in patients with anti-Ma2 associated encephalitis. *Neurology* 2007; 68:900-905.

- [50] Kinirons P, Fulton A, Keohan M, Brennan P, Farrel MA, Moroney JT. Paraneoplastic limbic encephalitis and chorea associated with CRMP-5 neuronal antibodies. *Neurology* 2003; 61: 1623-1624.
- [51] Kellinghaus C, Kraus J, Blaes F, Nabavi DG, Schabitz WR. CRMP-5 autoantibodies in testicular cancer associated with limbic encephalitis and choreiform dyskinesia. *Eur Neurol* 2007; 57:241-243.
- [52] Knudsen A, Bredolt A, Storstein A, Oteldal L, Dvanger S, Krossness B., Honnorat J, Vedeler CA. Antibodies to CRMP3-4 associated with limbic encephalitis and thymoma. *Clinical and Experimental Immunol* 2007; 147: 16-22.
- [53] Graus F, Saiz A, Lai M, Bruna J, López F, Sabater L, Blanco Y, Rey MJ, Ribalta T, Dalmau J. Neuronal surface antigen antibodies in limbic encephalitis. *Clinical immunological associations. Neurology* 2008; 71: 930-936.
- [54] Hart IK. Acquired neuromyotonia: a new autoantibody-mediated neuronal potassium channelopathy. *Am J Med Sci* 2000; 319:209-216.
- [55] Morvan A. De la chorée fibrillaire. *Gazette Hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie.* 1890; 27: 173-200.
- [56] Loscher WN, Wanschitz J, Reiners K, Quasthoff S. Morvan's syndrome: clinical, laboratory, and in vitro electrophysiological studies. *Muscle Nerve* 2004; 30: 157-163.
- [57] Lee Ek, Maselli RA, Ellis WG, Agius MA. Morvan's fibrillary chorea: a paraneoplastic manifestation of thymoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 857-862.
- [58] Barber PA, Anderson NE, Vincent A. Morvan's syndrome associated with voltage – gated K⁺ channel antibodies. *Neurology* 2000; 54: 771-772.
- [59] Liguori R, Vincent A, Clover L, Avoni P, Plazzi G, Cortelli P, Baruzzi A, Carey T, Gambetti P, Lugaresi E, Montagna P. Morvan's syndrome: Peripheral and central nervous system and cardiac involvement with antibodies to voltage gated potassium channels. *Brain* 2001; 124:2417-2426.
- [60] Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Deter N, Clover L, Parkinson A, Bien CG, Omer S, Bethan L, Rossor MN, Palace J. Potassium channel antibody associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain* 2004; 127:701-712.
- [61] Sekiguchi Y, Takahashi H, Masahiro M, Ito S, Shimada H, Hattori T, Kuwabara S. Potassium channel antibody associated encephalitis with hypothalamic lesion and intestinal pseudo-obstruction. *J Neurol Sci* 2007; 269: 176-179.

- [62] Jacob S, Irani SR, Rajabally Y, Grubneac A, Walters RJ, Yazaki M, Clover L, Vincent A. Hypothermia in VGKC antibody associated-limbic encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79:202-204.
- [63] Jarius S, Hoffma L, Clover L, Vincent A, Voltz R. CSF findings in patients with voltage gated potassium channel antibodies associated encephalitis. *J Neurol Sci* 2007; 268: 74-77.
- [64] Buckley C, Oger J, Clover L, 7•]•n E, Carpenter K, Psych D, Jackson M, Vincent A. Potassium Channel antibodies in two patients with reversible limbic Encephalitis. *Ann Neurol* 2001; 50: 73-78.
- [65] Pozo-Rosich P, Clover L, Saiz A, Vincent A, Graus F. Voltage-gated potassium channel antibodies in limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2003; 54:530-533.
- [66] Thieben MJ, Lennon A, Boeve BF, Aksamit AJ, Keegan M, Verninno M. Potentially reversible autoimmune limbic encephalitis with neuronal potassium channel antibodies. *Neurology* 2004; 62: 1177-1182.
- [67] Ohshita T, Kawakami H, Maruyama H, Kohriyama T, Arimura K, Matsumoto M. Voltage gated potassium channel antibodies associated limbic encephalitis in a patient with thimoma. *J Neurol Sci* 2006; 250: 167-169.
- [68] Jarius S, Hoffman LA, Stich O, Clover L, Rauer S, Vincent A, Voltz R. Relative frequency of VGKC and classical paraneoplastic antibodies in patients with limbic encephalitis. *J Neurol* 2008; 225: 1100-1101.
- [69] Zuliani L, Tavolato B, Giometto B, Vincent A, Graus F. Paraneoplastic limbic encephalitis associated with potassium channel antibodies: value of anti-glia nuclear antibodies in indentifying the tumor. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78:381-385.
- [70] Takamori M. Lambert-Eaton Myastenic Syndrome as an autoimmune chalcium channelopathy. *Biochem Biophy Research Communications* 2004; 322: 1347-1351.
- [71] Mason WP, Graus F, Lang B, Honnorat J, Delattre J-Y, Vallderiola F, Antoine JC, Rosenblum MK, Rosenfeld MR, Newsom-Davis J, Posner JB, Dalmau J. Small cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration, and the Lamber-Eaton myasthenic syndrome *Brain* 1997; 120: 1279-1300.
- [72] Lawn ND, Westmoreland BF, Kiely M, Lennon V, Vernino S. Clinical, magnetic resonance imaging and elettroencephalographic findings in paraneoplastic limbic encephalitis. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 1363-1368.
- [73] Weimer T, Boling W, Pryputniewicz D, Palade A. Temporal lobectomy for refractory status epilepticus in a case of limbic encephalitis. *J Neurosurg* 2008; 109: 742-745.

- [74] Vitaliani R, Maron W, Ances B, Zwerdling T, Jiang Z, Dalmau J. Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms and hypoventilation in ovarian teratoma. *Ann Neurol* 2005; 58:594-604.
- [75] Yang YW, Tsai CH, Chang FC, Lu MK, Chiu PY. Reversible paraneoplastic limbic encephalitis caused by a benign ovarian teratoma: report of a case and review of the literature. *J Neurooncol* 2006; 80: 309-312.
- [76] Koide R, Shimizu T, Koike K, Dalmau J. EFA6 like antibodies in paraneoplastic encephalitis associated with immature ovarian teratoma. *J Neurooncol* 2007; 81:71-74.
- [77] Dalmau J, 7•]•n E, Wu H, Masjuan J, Rossi JE, Vloscin A, Baehring JM, Koide R, King D, Mason W , Sansing LH, Dicter MA, Rosenfeld MR, Lynch DR. Paraneoplastic anti-N-Methyl-D aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol* 2007; 61: 25-36.
- [78] Shimazaki H, Ando Y, Nakano I, Dalmau J. Reversible limbic encephalitis with antibodies against the membrane of neurons of the hippocampus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 324-325.
- [79] Sansing LH, 7•]•n E, Ko MW, Baccon J, Lynch DR, Dalmau J. A patient with encephalitis associated with NMDA receptor antibodies. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3:291-296.
- [80] Izuka T, Sakai F, Ide T, Monzen T, Yoshi S, Iigaya M, Suzuki N, Hata T, Dalmau J. Anti-NMDA receptor encephalitis in Japan. *Neurology* 2008; 70: 504-511.
- [81] Novillo-Lòpez ME, Rossi JE, Dalmau J, Masjuan J. Treatment-responsive subacute limbic encephalitis and NMDA receptor antibodies in a man. *Neurology* 2008; 70: 728-729.
- [82] Wilkinson PC, Zeromski J. Immunofluorescent detection of antibodies against neurons in sensory carcinomatous neuropathy. *Brain* 1965; 88:529-538.
- [83] Graus F, Damau J, Rene R, Tarà M, Verschuuren JJ, Cardenal F, Vinolas N, Garcia del Muro J, Vadell C, Mason Wp, Rosel R, Posner JB, Real FX. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Onc* (1997) 15(8): 2866-2872.
- [84] Szabo A, Dalmau J, Manley G, Reosenfeld M, Wong E, Posner JB, Furneaux HM. HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* 1991; 67: 325-333.
- [85] Chung S, Jiang L, Chang S, Furneaux H. Purification and properties of HuD, a neuronal RNA binding protein. *J Biol Chem* 1996; 271:11518-11524.

- [86] Marusisch MF, Furneaux HM, Henion P, Weston JA. Hu neuronal proteins are expressed in proliferation neurogenic cells. *J Neurobiol.* 1994; 25:143-155.
- [87] Barami K, Iversen K, Furneaux H, Glodman SA. Hu proteins as an early marker of neuronal phenotypic differentiation by subependymal zone cells of the adult songbird forebrain. *J Neurobiol.* 1995; 28:82-101.
- [88] Manley GT, Silveira SM, Dalmay J, Posner JB. Hu antigens: reactivity with anti-Hu antibodies, tumor expression and major immunogenic sites. *Ann Neurol.* 1995; 38:102-110.
- [89] Greenlee JE, Brashear HR. Antibodies to cerebellar Purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. *Ann Neurol* 1983; 14:609-613.
- [90] Jeakle KA, Graus F, Houghton A, Cardoncardo C, Nielsen SL, Posner JB. Autoimmune response of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration to a purkinje cell cytoplasmic protein antigen. *Ann. Neurol.* 1985; 18: 592-600.
- [91] Peterson K, Roseblum MK, Kotanides H, Posner JB. Paraneoplastic cerebellar degeneration. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody positive patients. *Neurology* 1992; 42:1931-1937.
- [92] Dropcho EJ, Chen YT, Posner JB, Old LJ. Cloning of a brain protein identified by autoantibodies from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Proc Natl Acad Sci.* 1987; 84: 4552-4556.
- [93] Fathallah-Shaykh H, Wolf S, Wong E, Posner JB, Furneaux HM.. Cloning of a leucine- α -zipper protein recognized by the sera of patients with antibodies associated paraneoplastic cerebellar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88:3451-3454.
- [94] Okano HJ, Park WY, Corradi JP, Darnell RB. The cytoplasmic purkinje onconeural antigen cdr2 down regulates cMyc Function: implication for neuronal and tumor cell survival. *Genes Dev.* 1999; 16: 2087-2097.
- [95] Sakai K, Ogasawara T, Hirose G, Jaekle KA, Greenlee JE. Analysis of autoantibody binding to 52 kD paraneoplastic cerebellar degeneration associated antigen expressed in recombinant protein. *Ann. Neurol.* 1993; 33:373-380.
- [96] Corradi JP, Yang C, Darnell JC, Dalmay J, Darnell RB. A post transcriptional Regulatory Mechanism Restricts expression of the Paraneoplastic cerebellar degeneration antigen cdr2 to Immune privileged Tissues. *J. Neurosci.* 1997; 17(4):1406-1415.

- [97] Albert ML, Austin ML, Darnell RB. detection and treatment of activated T cells in the cerebro spinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 2000; 47:9-17.
- [98] Budde-Steffen C, Anderson NE, Rosemblum MK. Graus F, Ford D, Synek BJ, Wray SH, Posner, An antineuronal antibody in paraneoplastic opsoclonus *Ann Neurol* 1988 May;23(5):528-531.
- [99] Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, Rosemblum MK, Wray SH, Schold SC, Glantz MJ, Jaeckle Ka, Biran H, Lesser M. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann. Neurol.* 1991; 29: 241-251.
- [100] Pittock SJ, Luchinetti CF, Lennon VA. Antineuronal antibody type-2: Paraneoplastic accompaniments. *Ann. Neurol.* 2003;53:580-587.
- [101] Buckanovich RJ, Posner JB, Darnell RB. Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 1993; 11:657-672.
- [102] Yang YYL, Yin GL, Darnell RB. The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as autoantigen target in POMA patients with dementia. *Proc. Nat. Acad. Sci* 1998; 95:13254-13459.
- [103] Solimena M, Folli F, Denis-Dononi S, Comi GC, Pozza G, DeCamilli P, Vicari AM. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy and type I diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1988; 318:1012-1020.
- [104] Meinck HM, Faber L, Morgenthaler N, Seissler J, Maile S, Butler M, Solimena M, DeCamilli P, Scherbaum Antibodies against glutamic acid decarboxylase: Prevalence in neurological disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71:100-103.
- [105] Honnorat J, Saiz A, Giometto B, Vincent A, Brieva L, De Andres C, Mastre J, Fabien N, Vighetto A, Casamitjana R, Thivolet C, Tavolato B, Antoine J, Truillas P, Graus F. Cerebellar ataxia with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies: study of 14 patients. *Arch Neurol* 2001; 58:225-230.
- [106] Nemni R, Braghi S, Natali-Sora MG, Lampasona V, Bonifacio E, Comi G, Canal M. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in palatal myoclonus and epilepsy. *Ann Neurol* 1994; 36:665-667.
- [107] Walikonis JE, Lennon VA. Radioimmunoassay for glutamic acid decarboxylase (GAD65) autoantibodies as a diagnostic aid in stiff man syndrome and correlate of susceptibility to Type 1 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 1998; 73:1161-1166.

- [108] Folli F, Solimena M, Cofield R, Austoni M, Tallini G, Fassetta G, Bates D, Cartlidge N, Bottazzo GF, Piccolo G, DeCamilli P. Autoantibodies to a 128-kd protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328:564-551.
- [109] De Camilli P, Thomas A, Cofield R, Folli F, Lichte B, Piccolo G, Menick HM, Austoni M, Fassetta G, Bottazzo GF, Bates D, Cartlidge N, Solimena M, Kilimann MW. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128 kD autoantigen of the Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J. Exp. Med.* 1993; 178:2219-2223.
- [110] Rogemond V, Honnorat J. Anti-CV2 Antibodies and Paraneoplastic Neurological Syndrome. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2000; 19(1):51-59.
- [111] Honnorat J, Byk T, Kuster I, Aguera M, Richard D, Rogemond V, Quac T, Aunis D, Sobel A, Mattei MG, Kolattukudy P, Berlin MF, Antoine JC. Ulip/CRMP5 proteins are recognized by autoantibody in paraneoplastic neurological syndromes. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11:4226-4232.
- [112] Richard D, Rogemond V, Charrier E, Aguera M, Bagnard D, Belin MF, Thomasset N, Honnorat J. Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/ CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3A-sensitive oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 2001; 21:7203-7214.
- [113] Graus F, Dalmau J, Valldeoriola F, Ferrer I, Rene R, ArinC, Vecht CHJ, Arbizu T, Targa C, Moll JW. Immunological Characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J Neuroimmunol.* 1997; 74:55-61.
- [114] Dalmau J, Gultekin SH, Voltz R, Hoard R, DesChamps T, Balmaceda C, Batcelor T, Gerstner E, Eichen J, Frennier J, Posner JB, Rosenfeld M. Mal1, a novel neuron-testis specific protein, is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Brain* 1999; 122:27-39.
- [115] Battaler L, Wade DF, Fuller GN, Rosenfeld MR, Dalmau J. Cerebellar degeneration and autoimmunity to zinc-finger proteins of the cerebellum. *Neurology* 2002; 59:1985-1987.
- [116] Battaler L, Wade DF, Graus F, Stacey HD, Rosenfeld MR, Dalmau J. Antibodies to Zic4 in paraneoplastic neurologic disorders and small cell lung cancer. *Neurology* 2004; 62:778-782.
- [117] Graus F, Vincent A, Pozo-Rosich P, Sabater L, Saiz A, Lang B, Dalmau J. Anti-glial nuclear antibody marker of lung cancer-related paraneoplastic neurological syndromes. *J Neuroimmunol* 2005; 165:166-171.

- [118] Sabater L, Titulaer M, Saiz A, Verschuuren J, Gure AO, Graus F, Sox1 antibodies are a markers of paraneoplastic Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Neurology* 2008;70:940-928.
- [119] Lizcano JM, * | rasson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawlwy SA, Udd L, 0 lkela TP, Hardie DG, Alessi DR. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinase of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* 2004; 23: 833-843.
- [120] Kishi M, pan YA, Crump JG, Sanes JR. Mammalian SAD Kinase are required for neuronal polarization. *Science* 2005; 307: 929-932.
- [121] Carpentier AF, Delattre JY. The Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Clin. Rev. All. Immunol.*2001; 20: 155-158.
- [122] Hart IK, Waters C, Vincent A, Nevland C, Besson D, Pongs O, Morris C, Newsom-Devis J. Autoantibodies detected to expressed K⁺ Channel are implicated in neuromyotonia. *Ann Neurol* 1997; 41: 238-246.
- [123] Keopa KA, Elman LB, Lang B, Vincent A, Scherer SS. Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K⁺ channel: subunit specificity correlates with clinical manifestations. *Brain* 2006;129:1570-1584.
- [124] Sillevs Smitt P, Kinoschita A, De Leeuw B, Moll W, Cosemans M, Jaarsma D, Henzen-Logmans S, Vecht C, De Zeeuw C, Sekiyama N, Nakanishi S, Shigemoto R. Paraneoplastic Cerebellar Ataxia Due to Autoantibodies Against A Glutamate Receptor. *N.Engl. J.Med.* 2000; 342(1):21-27.
- [125] DeGiorgio LA, Kostanitinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus dsDNA antibodies cross react with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 2001; 7:1189-1193.
- [126] Takahashi Y, Mori H, Mishina M, Watanabe M, Fujiwara T, Shimomura J, Aiba H, Miyajima T, Saito Y, Nezu A, Nischida H, Imai K, Sakaguchi N, Kondo N. Autoantibodies to NMDA receptor in patients with chronic forms of epilepsia partialis continua. *Neurology* 2003;61: 891-896.
- [Kimura A, Sakurai T, Suzuki Y, Hayashi Y, Huzomi I, Watanabe O, Arimura K, Takahashi Y, Inuzuka T. Autoantibodies against glutamate receptor γ 2- subunity detected in a subgroup of patients with reversible autoimmune limbic encephalitis. *Eur Neurol* 2007; 58:152-158.
- [128] Takahashi Y. Epitope of autoantibodies to N-methyl-D-aspartate receptor heteromers in paraneoplastic limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2008; 64: 110-111.
- [129] Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Sillevs Smitt P, Vedeler Ch, Verschuren JJGM, Vincent A, Voltz R. Recommended

diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75:1135-1140.

[130] Dalamu J, Rosenfeld MR. Characterization of neuronal antigens and antineuronal antibodies. In Phillips MI, Evans D (Eds). *Methods in neuroscience. Neuroimmunology* (vol 24). San Diego: Academic Press; 1995. p 216-71.

[131] Alamowitch S, Graus F, Uchuya M, Renè R, Bescansa E and Delattre JY. Limbic encephalitis and small cell lung cancer. Clinical and immunological features. *Brain* 1997; 120: 923-928.

[132] Messori A, Lanza C, Serio A, Savolini U. Resolution of limbic encephalitis with detection and treatment of lung cancer: clinical-radiological correlation. *Eur J Radiol* 2003; 45: 78-80.

[133] Royas-Marcos I, Rousseau A, Keime-Guibert F, Renè R, Cartalat-Carel S, Delattre JY, Graus F. Spectrum of paraneoplastic neurologic disorders in women with breast and gynecologic cancer. *Medicine* 2003; 82:216-223.

[134] Mori O, Yamazaki M, Yamazaki M, Koizumi T, Ohaki Y, Katayama Y, Naito Z. A presenile case of limbic encephalitis and cerebellar degeneration with subacute onset of progressive dementia. *J Nippon Med Sch* 2004; 71 (6): 412-416.

[135] Moll JWB, Vecht CH. Paraneoplastic syndrome of the central nervous system. In Ch.J. Vecht (Ed) *Handbook of Clinical Neurology, Vol 25(69) Neuro-Oncology part III*. Elsevier Science 1997 p 349-365.

[136] Sutton I, Winer J, Rowlands D, Dalmau J. Limbic encephalitis and antibodies to Ma2: a paraneoplastic presentation of breast cancer. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69:266-268.

[137] Bien CG, Ubrach H, Schramm J, Soeder BM, Becker AJ, Voltz R, Vincent A, Elger CE. Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2007;69: 1236-1244.

[138] Kerling F, Blumcke I, Stefan H. Pitfalls in diagnosing limbic encephalitis- a case report. *Acta Neurol Scand* 2008: 1-4.

[139] Harloff A, Hummer S, Kleinschidt M, Rauer S. Anti-Ri antibodies and limbic encephalitis in a patient with carcinoid tumor of the lung. *J Neurol* 2005; 252:1404-1405.

[140] Launary M, Bozzolo E, Vennisacc N, Delemont E, Fredenrich A, Thomas P. Paraneoplastic limbic encephalitis with positive anti-Ri antibodies and mediastinal seminoma. *Rev Neurol (Paris)*. 2008: 164:612-619.

- [141] Cross SA, Saolma DR, Parisi JE, Kryzer TJ, Bradley EA, Mines JA, Lam BL, Lennon VA. Paraneoplastic autoimmune optic neuritis with retinitis defined by CRMP-5 IgG. *Ann Neurol* 2003; 54: 38-50.
- [142] Antoine JC, Honnorta J, Anterion CT, Aguera M, Absi L, Fornel P, Michel D. Limbic encephalitis and immunologica Perturbation in two patients with thymoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58: 706-710.
- [143] Honnorat JC, Antoine JC, Derrington E, Auera M, Belin MF. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61: 270-278.
- [144] Bernal F, Shams'ili S, Rojas I, Sanchez-Valle R, Saz A, Dalau J, Honnorat J, Sillevs Smitt, Graus F. Anti-Tr antibodies as a markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodkin's disease. *Neurology* 2003; 60:230-234.
- [145] Kung S, Mueller PS, Geda YE, Krahan LE. Delirium resulting from paraneoplastic limbic encephalitis caused by Hodkin's disease. *Psychosomatics* 2002; 43: 498-501.
- [146] Bernard P, Vinzio S, Talarmin F, Kadouri A, Flocard F. Hodgkin's disease manifesting as paraneoplastic limbic encephalitis. *Rev Med Interne* 2003; 24: 257-260.
- [147] Epaulard O, Courby S, Pavese P, Grand S, Laramas M, Molina L, Brion JP, Colle PF, Sotto JJ. Paraneoplastic acute diffuse encephalitis revealing Hogkin's disease. *Leuk and Lymph* 2004; 45:2509-2512.
- [148] Bataller L, Kleopa KA, Wu GF, Rossi JE, Rosenfeld MR, Dalmau J. Autoimmune limbic encephalitis in 39 patients: immunophenotypes and outcomes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78:381-385.
- [149] Maddison P, Lang B. Paraneoplastic neurological autoimmunity and survival in small sell lung cancer. *J Neuroimmunol* 2008; 159-162.
- [150] SherPerd JD, Haganir RL. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:613-643.
- [151] Sprengel R. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Tissue Res* 2006; 326:447-445.

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato supportato da un grant della Commissione Europea QLGT-CT-2002-01756; LSSM-CT-2005 518174.

Si ringraziano inoltre i membri del PNS-Euronetwork prof. F Graus, prof. W Grisold, prof. A Vincent, dr. D Pimiras, prof. CA Vedeler, prof. JC Antoine, prof. J Honnorat, prof. P Sillevs Smitt, prof. J Verschuuren, prof. R Voltz, dr. F Blease, dr. L Lorusso, dr. Rauer, dr. J Rees, dr. Z Rodi, prof. P Sturac, prof. P Tonali, dr.ssa MC Vigliani, prof. G Vita, dr. F Carpentier per la collaborazione ed il prezioso aiuto.

Si ringraziano la dr.ssa C Rossi ed il dr. G Bertolini per il prezioso aiuto nella elaborazione statistica dei dati.

Si ringrazia il dr. B Giometto, la dr.ssa J Flemming ed il dr. C Baracchini per l'aiuto ed il supporto.

Si ringrazia il prof. J. Dalmau per l'aiuto e la collaborazione nell'identificazione di nuovi antigeni.