

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Linea di ricerca n. 1 : APPROCCIO INTERDISCIPLINARE DI PSICHIATRIA BIOLOGICA AI DISORDINI NEUROCOGNITIVI E NEUROLOGICI DEGLI ADULTI

01 : Studio del trascrittoma e del genoma nella malattia di Parkinson, in varie forme di parkinsonismo e nella sindrome delle gambe senza riposo, e correlazioni di comorbidità con altre malattie

Responsabile: Salemi Michele

Programma:

Parole chiave: gene expression; Parkinson's disease; parkinsonism, restless legs syndrome; comorbidity

Altri enti coinvolti: 1) Laboratorio di neurobiologia e neuroanatomia, Dipartimento di Bioscienza, Università degli Studi di Milano,
2) Genomix4Life Srl, Genome Research Center for Health-CRGS, Baronissi (SA), Italia;

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Descrittiva

Project Classification IRG: Molecular, Cellular, and Developmental Neuroscience

Project Classification SS: Cellular and Molecular Biology of Neurodegeneration - CMND

Descrizione: Lo studio mira a valutare l'espressione degli RNA (acido ribo-nucleico) nei tessuti cerebrali post-mortem di persone che erano affette dal morbo di Parkinson, i dati ottenuti saranno confrontati con tessuti cerebrali post-mortem di persone che non avevano il morbo di Parkinson. Intendiamo valutare i diversi tipi di RNA, mRNA (RNA messaggero), lncRNA (RNA lungo non codificante) e microRNA (micro RNA). Lo scopo della ricerca è quello di valutare direttamente sul cervello come si comporta l'espressione genica totale (trascrittoma) nei soggetti con malattia di Parkinson rispetto a una coorte di controllo. Inoltre negli stessi tessuti verrà studiata l'espressione di alcune proteine. Nell'ambito del progetto lo studio del trascrittoma sarà esteso ad una casistica di parkinsonismi e sindrome delle gambe senza riposo su leucociti di sangue periferico. Tutti i dati ottenuti saranno confrontati con i dati di espressione genica di altre malattie.
L'altro capitolo dello studio riguarda l'identificazione di nuove mutazioni geniche correlate alla malattia di Parkinson, a varie forme di parkinsonismo e ad altre sinucleinopatie mediante sequenziamento NGS.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti: Durante l'anno 2022 sono stati effettuati degli studi di sequenziamento dei ncRNA in leucociti di soggetti con malattia di Parkinson confrontati con una casistica di soggetti normali, questi studi ci hanno permesso di individuare miRNA sovra o sotto espressi associati alla malattia di Parkinson stessa, tali dati sono stati pubblicati su Int J Mol Sci in un lavoro dal titolo "Role and Dysregulation of miRNA in Patients with Parkinson's Disease". Gli stessi dati sono stati utili, insieme ai dati della letteratura, per scrivere una Review su Cells dal titolo "Examples of Inverse Comorbidity between Cancer and Neurodegenerative Diseases: A Possible Role for Noncoding RNA". Inoltre è stato eseguito uno studio per valutare l'espressione dell'mRNA del gene Humanin (sempre in leucociti di soggetti con malattia di Parkinson confrontati con una casistica di soggetti normale), anche in questo caso i risultati sono stati oggetto di una pubblicazione dal titolo "Humanin gene expression in subjects with Parkinson's disease", su Mol Biol Rep.

Attività previste Attività 2023:

Per il 2023/24 ci proponiamo di confrontare i dati di espressione della casistica con malattia di Parkinson (lavoro già pubblicato) e i dati di espressione di soggetti con carcinoma vescicale. Inoltre stiamo facendo uno studio del trascrittoma in tessuti cerebrali inclusi in paraffina sia su una casistica di soggetti con malattia di Parkinson sia su una casistica di soggetti normali. Altro studio che riguarda il trascrittoma è quello in corso riguardante soggetti con Sindrome delle gambe senza riposo (RLS).

Background: Parkinson's disease and the various forms of parkinsonisms and other synucleinopathies occupy a large part of neurodegenerative diseases. The study of transcriptome (mRNA, lncRNA and micro RNA) certainly plays a role of primary importance in the identification of genes and mechanisms of gene regulation that take important roles in these multifactorial diseases. In addition, the study of the genomics of the neurodegenerative diseases in question plays an extremely important role in the diagnostic aspect.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

- Hypothesis and Significance:** We hypothesize that we will be able to identify very precise gene expression profiles in the various neurodegenerative diseases under study. This will allow us to have other means in the differential diagnosis between Parkinson's disease and parkinsonisms or Restless Legs Syndrome
- Specific Aims:** To study gene expression directly on postmortem brains of subjects with Parkinson's disease. In addition, these data can be compared with data obtained from peripheral blood of all cases under study.
- Expected outcomes:** We expect to have new target genes differentially expressed or with yet unknown mutations on the various diseases under study, especially from postmortem brain tissue.
- Significance and Innovation:** Use innovative RNA or DNA sequencing methods to directly study gene expression and genomics on brain tissue in a large case series. Also compare these data with other diseases such as cancers.
- Translational relevance:** The data obtained and subsequently published may have a direct impact on the early detection of the various neurodegenerative diseases under study. In addition, the identification of new genetic targets may contribute to the therapeutic aspect of the same diseases of the study.
-

02 : Valutazione della disfunzione mitocondriale nelle malattie neurodegenerative

Responsabile: Borgione Eugenia

Programma:

Parole chiave: malattie neurodegenerative; mitocondri, NGS, Seahorse Analyzer

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Molecular, Cellular, and Developmental Neuroscience

Project Classification SS: Cellular and Molecular Biology of Neurodegeneration - CMND

Descrizione: Durante tale progetto verrà effettuato l'arruolamento annuo di circa 100 soggetti con PD, parkinsonismo o diverse forme di demenza afferenti all'UOC di Neurologia per l'Involuzione Cerebrale, dove saranno sottoposti a dettagliate indagini cliniche e strumentali. I soggetti in cui verrà riconosciuta una forma di demenza vascolare o secondaria ad una patologia nota, verranno esclusi dalle successive indagini genetico-molecolari volte all'identificazione di mutazioni in geni coinvolti nella replicazione e nel mantenimento del mt-DNA. Tali indagini verranno condotte su campioni di DNA estratto da sangue periferico mediante l'uso della tecnologia NGS; mentre i test relativi alla respirazione mitocondriale verranno effettuati su colture di linfociti estratti da sangue periferico, utilizzando il Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Biosciences, Billerica, MA) in accordo con le istruzioni del produttore. I dati saranno normalizzati alla conta delle cellule e quindi alla media dei campioni di controllo sani. L'analisi verrà eseguita utilizzando il software Wave. Verrà anche realizzato un database nel quale saranno inseriti i dati demografici e clinici dei pazienti reclutati per lo studio, che verranno man mano integrati con i risultati degli studi genetici e funzionali, utili per le eventuali correlazioni genotipo-fenotipo.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti: Durante questo primo anno sono stati reclutati 100 soggetti con PD, parkinsonismo o diverse forme di demenza e sottoposti a dettagliate indagini cliniche e strumentali presso l'UOC di Neurologia per l'Involuzione Cerebrale. In 65 soggetti sono state riconosciute forme di demenza secondaria ad una patologia nota, e quindi esclusi dalle successive indagini. I restanti 35 soggetti sono stati sottoposti ad indagini genetico-molecolari volte all'identificazione di mutazioni in geni coinvolti nella replicazione e nel mantenimento del mtDNA.

Tale analisi, condotta mediante Next Generation Sequencing su pannelli genici specifici, ha rilevato la presenza di 3

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

mutazioni nel gene POLG1 in 2 soggetti. Più specificatamente, la mutazione eterozigote G268A in un soggetto affetto da malattia di Parkinson, e le mutazioni I251L e P587L anch'esse in eterozigosi in un secondo soggetto affetto da malattia di Parkinson in fase avanzata.

La mutazione G268A è stata precedentemente associata a casi sporadici di PEO in omozigosi o in eterozigosi con la mutazione A467T [Del Bo 2003; Di Fonzo 2003]. Studi successivi hanno evidenziato la suddetta mutazione in eterozigosi in associazione con PEO e neuropatia sensoriale [Gonzalez-Vioque 2006] e con parkinsonismo, distonia, disabilità intellettiva, sindrome epatocerebrale, ptosi e neuropatia [Blok MJ 2009].

Le mutazioni I251L e P587L, generalmente in cis, sono tra le mutazioni più comuni del gene POLG, sono state descritte sia in eterozigosi che in omozigosi ed eterozigosi composta con un'altra variante potenzialmente patogenetica presente in trans [Scuderi et al 2015].

Queste 2 mutazioni sono state associate a sindrome da deplezione del mtDNA, ma anche a PEO autosomica dominante in età adulta con altri segni clinici come miopia, sordità neurosensoriale, ipogonadismo, cataratta, neuropatia sensoriale e parkinsonismo [Mancuso et al. 2004]. Più recentemente, sono state riportate anche in casi di malattia di Parkinson ad esordio precoce [Ma et al. 2020].

Queste osservazioni rafforzano l'ipotesi di un ruolo patogenetico delle mutazioni POLG1 nella malattia di Parkinson.

Inoltre, durante questo primo anno, sono stati svolti esperimenti preliminari al fine di mettere a punto e validare il protocollo per l'esecuzione dell'analisi funzionale mediante Seahorse su colture linfocitarie.

Attività previste Attività 2023:

Per il secondo anno ci si propone di proseguire l'arruolamento di ulteriori 100 soggetti sia affetti da PD o parkinsonismo afferenti all'UCO di Neurologia per l'Involuzione Cerebrale, per l'esecuzione di dettagliate indagini cliniche e strumentali. I soggetti in cui non verrà riconosciuta una forma di demenza vascolare o secondaria ad una patologia nota, saranno sottoposti alle successive indagini genetico-molecolari mediante Next Generation Sequencing su pannelli di geni coinvolti nella replicazione e nel mantenimento del mt-DNA. Si avvieranno inoltre i test relativi alla respirazione mitocondriale su colture di linfociti estratti da sangue periferico, utilizzando il Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Biosciences, Billerica, MA) secondo il protocollo messo a punto presso il nostro laboratorio, al fine di valutare la presenza ed il grado di disfunzione mitocondriale nei pazienti oggetto del nostro studio.

Background: Neurodegenerative diseases, including Alzheimer (AD), Parkinson (PD), Huntington (HD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), are a large group of neurological diseases characterized by an inexorable loss of a specific type of neurons. This class of diseases poses a serious clinical challenge because once the neurodegeneration begins, it can only be slowed down but not fully halted (Fu et al., 2018). The primary neuronal loss varies with the disease such as striatal regions in PD, striatal and cortical regions in HD, hippocampal and cortical regions in AD, and spinal motor neurons and cortical regions in ALS (Ilieva et al., 2009; Marambaud et al., 2009; Kiaei, 2013). In the last years, accumulating evidence has converged on an impairment of mitochondrial functioning in several neurodegenerative disorders, including PD, HD, ALS, and AD (Johri and Beal, 2012; Briston and Hicks, 2018; Muddapu et al., 2020). Although the mitochondrial dysfunction may be due to a direct involvement of the primary oxidative phosphorylation (OXPHOS), more often it is thought to be secondary to impaired mitochondrial dynamics (e.g., shape, size, fission-fusion, distribution, movement, etc.) or quality control. This hypothesis has been further supported by the finding that several genes responsible for familial forms of PD, such as Pink1, Parkin, and DJ-1, exert different roles in mitochondrial functions, whereas insoluble alpha-synuclein (alpha-syn), that accumulates in PD, in DLB, and in other synucleinopathies, probably damages mitochondria directly. In addition, mutations or polymorphisms in both mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA have been implicated in the pathogenesis of DLB and PD, including subjects at risk of these conditions. Mutations in proteins required for mtDNA replication, such as those in mitochondrial DNA polymerase gamma and in the helicase Twinkle, cause rare forms of cerebellar degeneration (Hakonen et al., 2008). Furthermore, some recent evidence have also indicated that mutations in the POLG1 gene, essential for mtDNA replication and repair, may be involved in the above-mentioned neurodegenerative disorders (Hsieh et al., 2019).

References

Briston T, Hicks AR. Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative proteinopathies: mechanisms and prospects for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans.* 2018; 46(4):829-842.
Fu H, Hardy J, Duff KE. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 2018; 21:1350-1358.
Hakonen AH, Goffart S, Marjavaara S, Paetau A, Cooper H, Mattila K, Lampinen M, Sajantila A, Lönnqvist T, Spelbrink JN, Suomalainen A. Infantile-onset spinocerebellar ataxia and mitochondrial recessive ataxia syndrome are associated with neuronal complex I defect and mtDNA depletion. *Hum Mol Genet.* 2008 Dec 1;17(23):3822-35.
Hsieh PC, Wang CC, Tsai CL, Yeh YM, Lee YS, Wu YR. POLG R964C and GBA L444P mutations in familial Parkinson's disease: Case report and

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

literature review. Brain Behav. 2019 May;9(5):e01281. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. J. Cell Biol. 2009; 187(6):761-72.
Johri A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2012; 342:619-630.
Kiaei M. New hopes and challenges for treatment of neurodegenerative disorders: great opportunities for young neuroscientists. Basic Clin. Neurosci. 2013; 4:3-4.
Marambaud P, Dreses-Werringloer U, Vingtdoux V. Calcium signaling in neurodegeneration. Mol. Neurodegener. 2009; 4:20.
Muddapu VR, Dharshini SAP, Chakravarthy VS, Gromiha MM. Neurodegenerative Diseases - Is Metabolic Deficiency the Root Cause?. Front Neurosci. 2020; 14:213.

Hypothesis and Significance: There are literature data suggesting that nuclear genes implicated in replication and maintenance of mt-DNA, are involved in neurodegenerative diseases and in particular in Parkinson's disease. For this reason, we believe that the genetic study of these genes in PD, parkinsonism and different types of dementia will lead us to the identification of new genotype-phenotype correlations and to better understand the underlying pathogenetic mechanisms.

Specific Aims: We propose to conduct the mutation analysis by NGS of nuclear genes involved in mitochondrial replication and maintenance in patients with Parkinson disease, parkinsonism or different types of dementia, in order to evaluate the involvement of these genes in the studied population. Besides, in this study we will perform bioenergetic characterization in primary peripheral blood cells from this cohort of patients to test the hypothesis that mitochondrial parameters correlate with clinical features. Measurements of mitochondrial respiration are, in fact, strong indicators of the functional bioenergetic capacity of mitochondria, and of overall cellular health. For this reason, we will perform our functional studies with the Seahorse Extracellular Flux Analyzer, that uses a plate-based approach and fluorescence detectors to accurately and simultaneously measure cellular oxygen consumption rates (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) of multiple samples in real time.

Expected outcomes: Based on literature data and our preliminary data, we expect to demonstrate an involvement of genes essential for mitochondrial replication and maintenance in neurodegenerative diseases and identify an eventually different pathway in patient with Parkinson disease compared to parkinsonism or to the different types of dementia. Furthermore, functional studies carried out on multiple patient groups will aid in identifying common and diverging PBMC pathology across neurodegenerative diseases.

Significance and Innovation: The results of this study will enable us to improve the knowledge about the involvement of nuclear genes essential for mtDNA replication and maintenance in neurodegenerative diseases and will be key to understanding the potential use of PBMCs as biomarkers and therapeutic targets.

Translational relevance: Carrying out these investigations is extremely important because, thoroughly understanding the mitochondrial relationship with neurodegenerative diseases can open the way for the development of targeted therapies, potentially modifying the course of these progressive degenerative disorders with an enormous impact for the life of these patients.

03 : Uso di strumenti tecnologici per la riabilitazione delle attività di vita quotidiana in pazienti con disturbi neurocognitivi acquisiti

Responsabile: Panerai Simonetta

Programma:

Parole chiave: dementia; mild cognitive impairment - MCI; Instrumental Activity of Daily Living - IADL; Virtual Reality - VR; VR devices; m-NCD; M-NCD; IADL App; TV-Touch; personal computer - PC; tablet; visore VR; virtual camera CAVE

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Tecnologie abilitanti

Area di interesse: Terapeutica

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Project Classification IRG: Biobehavioral and Behavioral Processes

Project Classification SS: Adult Psychopathology and Disorders of Aging - APDA

Descrizione: Si prevede il completamento delle app in corso di sviluppo, la creazione di nuove app, da utilizzare con TV touch, tablet, CAVE e VISORE VR. Proseguirà l'arruolamento dei pazienti per aumentare il numero del campione. I software saranno organizzati secondo i principi e le procedure della psicologia comportamentale, utilizzando la task analysis, il concatenamento total-Task, il rinforzamento, la correzione, i prompts e la presa dati continua.

I software saranno organizzati secondo i principi e le procedure della psicologia comportamentale, utilizzando la task analysis, il concatenamento total-Task, il rinforzamento, la correzione, i prompts e la presa dati continua.

Nel primo anno dello studio sarà data priorità alla costruzione di versioni, per tablet e VR-cave, dei software già esistenti. Al contempo sarà dato ampio spazio al reclutamento del campione che effettuerà il training sulle IADL.

Prima del training, saranno dedicati uno o due incontri per la prova e la spiegazione dei programmi. Tre giorni circa saranno dedicati al baseline. La registrazione dei dati includerà: tempo totale di esecuzione del task, numero di risposte corrette, numero di errori (risposte sbagliate e risposte non date) e numero di aiuti necessari. Prima dell'avvio del training, alla fine dello stesso sarà effettuata una prova in vivo, in ambiente adeguatamente attrezzato allo scopo, per verificare la capacità di esecuzione dei tasks nel contesto naturale.

Il campione sarà formato da pazienti con demenza (M-NCD) in fase iniziale o prodromica (m-NCD) che hanno fatto richiesta di intervento di riabilitazione neuropsicologica cognitiva presso l'IRCCS OASI.

I criteri di inclusione per i pazienti con M-NCD sono: a) presenza dei criteri diagnostici del DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013) per il M-NCD; b) punteggio di 1 o 2 al Clinical Dementia Rating (Hughes et al., 1982); c) punteggio fra 10 e 23 al Mini Mental State Examination (MMSE; Folstein et al., 1975); d) perdita di una o più Instrumental Activities of Daily Living (IADL; Lawton and Brody, 1969); e) vista e udito sufficientemente integri; f) presenza di sufficienti abilità di comunicazione.

I criteri di inclusione per i pazienti con m-NCD sono: a) presenza dei criteri diagnostici del DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013) per il m-NCD; b) punteggio di 0.5 al Clinical Dementia Rating (Hughes et al., 1982); c) punteggio compreso fra 1-2 DS (o fra 3° e 16° percentile) ai test cognitivi d) difficoltà riferite dal paziente o dai familiari in una o più Instrumental Activities of Daily Living (IADL; Lawton and Brody, 1969); e) vista e udito sufficientemente integri; f) presenza di sufficienti abilità di comunicazione.

Gli strumenti di assessment includono: MMSE (MOCA per m-NCD); Coloured Progressive Matrices (CPM); Digit Span e test di Corsi; test delle 15 Parole di Rey; Frontal Assessment Battery; Activities of Daily Living scale (ADL) e Instrumental-ADL (IADL).

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Nel corso dell'anno 2022 sono stati inclusi nello studio 5 nuovi pazienti, di cui 4 nel gruppo sperimentale e 1 nel gruppo di controllo. 3 partecipanti avevano una diagnosi di disturbo neurocognitivo lieve, 2 di disturbo neurocognitivo maggiore. Le eziologie erano: 2 malattia di Alzheimer, 2 deficit cognitivi da encefalopatia, 1 degenerazione corticobasale. L'età cronologica media dei pazienti era di 69 anni, la media di istruzione 8,6 anni. Ai partecipanti del gruppo sperimentale sono state somministrate 10 sessioni di training virtuale su 4 abilità di vita quotidiana.

Relativamente allo sviluppo delle app, è stata completata una nuova app per tablet (fare la spremuta), e un'app per Oculus Rift (apparecchiare). Ambedue devono essere testate sui pazienti. Sono in fase di sviluppo altre due app per visore VR, e il trasferimento su CAVE delle app per tablet.

Partecipazione a Convegni:

- Simonetta Panerai, Valentina Catania, Francesco Rundo, Marco Lombardo, Donatella Gelardi, Daniele Lombardo, Domenica Tasca, Sabrina Musso, Giuseppina Prestianni, Stefano Muratore and Raffaele Ferri. Abilità strumentali di vita quotidiana: un training di realtà virtuale non immersiva per persone con disturbo neurocognitivo maggiore. 22mo Congresso Nazionale AIP. 24/26 marzo 2022. Firenze. Oral presentation

- Simonetta Panerai, Valentina Catania, Francesco Rundo, Marco Lombardo, Donatella Gelardi, Daniele Lombardo, Domenica Tasca, Sabrina Musso, Giuseppina Prestianni, Stefano Muratore and Raffaele Ferri. Abilità strumentali di vita quotidiana: un training di realtà virtuale non immersiva per persone con disturbo neurocognitivo maggiore. Convegno: *Malattia di Alzheimer dalla pandemia ai giorni nostri*, 22 Settembre 2022. Caltanissetta, Asp di Caltanissetta, Dipartimento di cure primarie ed integrazione socio-sanitaria. Oral presentation

Attività previsteAttività 2023:

Si prevede di completare lo sviluppo delle nuove app visore VR e CAVE. Vanno testate con i pazienti l'app per oculus e quella per tablet sviluppate durante il 2022.

Continuerà l'arruolamento di pazienti con M-NCD e m-NCD con diverse eziologie.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Verrà avviata la somministrazione di questionari per indagare la preferenza del paziente tra diversi sistemi tecnologici (tablet vs CAVE vs visori VR).

Background: It is estimated that 35.6 million people currently live with dementia in the world, and this number should reach 115.4 million people by 2050. Treating dementia symptoms, therefore, represents a challenge for clinicians and the scientific community, and pharmacological treatments fail to sufficiently control or decrease them. The innovative use of technology-based interventions for people with neuro-cognitive disorders (NCD) is a growing area of study and offers many possibilities for improving the independence and the quality of life of people with such clinical disorders. Among the technology-based interventions, the Virtual Reality (VR) seems to be more effective than traditional approaches, producing positive outcomes in a shorter time, as well as enhancing the brain neuroplasticity. VR provides three-dimensional life-like environments at a full (e.g., virtual camera or oculus) or non-immersive level (e.g., the desktop visual display system), allowing patients to do an interactive experience, based on "learning by doing". Only few studies focused on the effectiveness of VR in patients with NCD, some recent reviews have found mild-to-moderate effects, especially by using the semi-immersive devices. The improvements were found either in motor skills, or in cognitive and non cognitive symptoms. As far as the functional daily life skills (FLS) are concerned, training with VR in patients with dementia seem to demonstrate the same effectiveness than the classic rehabilitation. Two of our previous studies showed the effectiveness of the FLS-VR training in re-learning skills, and a positive impact on the same skills in the natural environment, with spontaneous generalizations. Moderate-to-high levels of satisfaction among participants were also found.

Hypothesis and Significance: Based on the literature studies and on our preliminary results, we expect patients with mNCD and MNCD to improve their performances both in the VT sessions and in the natural environment. The study is important in the panorama of non-pharmacological treatments for dementia, since VT can achieve results similar to those of rehabilitation in the natural environment, and offers a number of advantages, including well sequenced and organized programs for reducing errors, providing immediate feedback on performances, pleasantness and motivating tasks, computerized data collection. VT might be implemented both in a clinical setting and at home, where the rehabilitation program can continue, with lower expenses for the health system.

Specific Aims: 1. To develop of new 3D apps on functional living skills, to be used with multiple technological devices (touch TV, personal computer, tablet and VR camera); 2. to check the effectiveness of a non immersive VT in a larger sample of patients with mNCD and MNCD; 3. to obtain information on the technological devices preferred by patients.

Expected outcomes: To increase both the number of apps on FLS, and the number of administrations of the VR training to patients with mNCD and MNCD. From the comparison between EG and CG, we expect to find significant differences in the in-vivo tests. We also expect that users highly appreciate this new kind of rehabilitation.

Significance and Innovation: This is an innovative proposal of a rehabilitation system, and some devices appear simple to be used and independently managed by patients; it can be adapted to both clinical and home settings, combining VR and remote control.

Translational relevance: If expected results are confirmed, a new VR procedure can be validated, aimed at reducing the decline in FLS of people with mNCD and MNCD. This approach may allow a personalized clinical management of these patients in a sustainable way. This new rehabilitation approach will have a strong impact on the Italian Public Health System, as it can set up both in the clinical setting and at home, where the rehabilitation program can continue, with lower expenses for the health system.

04 : Disturbo neurocognitivo maggiore e lieve: caratteristiche cognitive e comportamentali, e intervento non farmacologico

Responsabile: Panerai Simonetta

Programma:

Parole chiave: disturbo neurocognitivo maggiore M-NCD; demenza; disturbo neurocognitivo lieve m-NCD; mild cognitive impairment MCI; trattamento non-farmacologico; telemedicina; realtà virtuale; memoria prospettica.

Altri enti coinvolti:

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Tecnologie abilitanti

Area di interesse: Terapeutica

Project Classification IRG: Biobehavioral and Behavioral Processes

Project Classification SS: Adult Psychopathology and Disorders of Aging - APDA

Descrizione: Relativamente all'obiettivo a) verrà proseguito l'arruolamento già avviato di pazienti con m-NCD a cui somministrare il software di memoria prospettica.

Metodologia: il gruppo di controllo di soggetti sani sarà reclutato all'università di Parma; il gruppo sperimentale all'IRCCS Oasi Maria SS.

Criteri di inclusione:

- 1) Età compresa tra i 55 e i 75 anni;
- 2) Diagnosi di MCI secondo i criteri usuali. Prestazione di almeno 1.5 SD al di sotto della popolazione normativa su almeno 2 test di una batteria standardizzata di test neuropsicologici; saranno selezionati partecipanti con aMCI e naMCI.
- 3) Prestazioni nella norma alle scale ADL e IADL, usate per valutare l'abilità di gestione della routine quotidiana.
- 4) Assenza di demenza, misurata tramite il MMSE con un punteggio di 24 o superiore;

Criteri di esclusione:

- 1) Presenza di disturbi psichiatrici maggiori, lesioni cerebrali vascolari, malattie sistemiche e metaboliche che possono influenzare lo status cognitivo valutato da esami neuropsichiatrici, neuropsicologici e di laboratorio;
- 2) Assunzione di farmaci che hanno effetto sul funzionamento cerebrale.

Strumenti: inserimento di compiti focali e non focali all'interno della batteria neuropsicologica usata per persone con MCI.

La batteria testologica comprende: il MOCA (Santangelo et al., 2015), MODA sub-test Apraxia (Arrigoni e De Renzi, 1964), Il Test di Corsi (Orsini et al., 1987) per la misurazione dello span spaziale e lo span di cifre (Orsini et al., 1987), il test di ripetizione di parole bisillabiche (Spinner et al., 1987), le 15 parole di Rey (Carlesimo et al., 1996), il test Memoria di prosa (Spinner et al., 1987) e, infine, la CDR-Clinical Dementia Rating Scale (Morris, 1993).

Compiti specifici:

Compito PM basato sull'evento: ricordare di premere un tasto ogni volta che compare una determinata parola sul pc

Compito non focale: premere un tasto ogni volta che appare una parola appartenente ad una determinata categoria

Valutazione dell'Updating: compito di Miyake et al. (2000) (Richiamo di parole - in tutto 33- in 4 prove diverse)

Valutazione dell'inhibition: compito di segnale di stop (Logan, Schachar e Tannock, 1997)

Valutazione dello shifting: compito di giudizio in base a maiuscolo/minuscolo, e in base al colore.

Relativamente all'obiettivo b) sui trattamenti non farmacologici, saranno analizzati studi che hanno utilizzato specifici approcci in modalità tradizionale (per es, ABA e Montessori) e saranno portate avanti applicazioni cliniche in pazienti con m-NCD e M-NCD.

Relativamente ai nuovi approcci tecnologici, saranno sperimentati trattamenti a distanza tramite tablet per la prosecuzione delle attività riabilitative avviate durante i ricoveri di riabilitazione; inoltre si proseguirà con lo sviluppo di app sulle abilità di vita quotidiana, che i pazienti potranno utilizzare in fase di ricovero di riabilitazione.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Riguardo al primo obiettivo, prosegue l'indagine sulla memoria prospettica, in collaborazione con l'università di Parma, per uno studio in pazienti con m-NCD. Ai pazienti individuati viene somministrata una batteria neuropsicologica che include MOCA, MMSE, 15 Parole di Rey, test Apraxia, FCSRT, Corsi e Digit span, span di parole Bisillabiche, memoria di Prosa, CDR. Dopo la valutazione viene somministrato uno specifico software sviluppato dall'Università di Parma, contenente compiti focali e non focali all'interno di una batteria testologica (crono.cs.unibo.it/admin/). Al momento sono stati reclutati 9 pazienti, 6 maschi e 3 femmine, con età media di 68 anni e scolarità 10 anni.

In riferimento al secondo obiettivo, sono stati analizzati i dati raccolti per la verifica dell'efficacia del trattamento cognitivo g-ICA (group-Intensive Cognitive Activation) in atto nel nostro istituto. Sono stati confrontati gli esiti di due successivi ricoveri di riabilitazione cognitiva, che hanno evidenziato in ambedue i ricoveri una differenza fra il pre- e il post-trattamento in tutti i test neuropsicologici usati per l'assessment. I dati sono stati pubblicati sulla rivista Life Span del nostro istituto.

È stata avviato l'uso di specifiche procedure dell'Applied Behavior Analysis i pazienti con disturbi cognitivi acquisiti, e l'uso della teleneuroriabilitazione, sia per la stimolazione cognitiva (tramite tablet e piattaforme web) sia per la terapia di riorientamento alla realtà.

In collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria Elettrica, Elettronica e Informatica, Università degli Studi di Catania, è

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

stata avviata una collaborazione al progetto "RehaStart: Ricerca e sviluppo di tecnologie e metodologie per l'implementazione di soluzioni di teleriabilitazione ad alta sostenibilità economica e sociale", in cui l'Oasi è laboratorio clinico per il reclutamento dei pazienti e la somministrazione del protocollo cognitivo predisposto nei tablet Khymeia. Da febbraio a Dicembre 2022 sono stati reclutati complessivamente 23 pazienti (15 maschi e 8 femmine), 18 dei quali hanno completato interamente il training di 5 sedute di terapia con dispositivo VRRS Khymeia con videoregistrazione; gli altri 5 pazienti hanno effettuato un numero di sedute inferiori e il training è stato sospeso per diverse motivazioni: difficoltà a gestire autonomamente il dispositivo, o dimissione anticipata. L'età media dei pazienti è 62,4 anni, la scolarità media 9,6 anni. 8 pazienti avevano una diagnosi di Malattia di Parkinson; 7 avevano esiti di eventi vascolari (ictus, emorragia e deficit cognitivo da cerebrovasculopatia); 2 atassia cerebellare; 2 trauma cranico; gli altri avevano deficit cognitivi conseguenti ad altre cause mediche (asportazione chirurgica di meningioma, encefalopatia); 1 paziente aveva diagnosi di Sclerosi Multipla. 10 pazienti avevano una diagnosi neuropsicologica di Disturbo Neurocognitivo Lieve, 14 avevano deficit cognitivi specifici (deficit mnesici, visuo-spaziali, deficit delle funzioni esecutive).

In collaborazione con l'IRCCS Mondino di Pavia capofila dei progetti RCR-2020-23670067 e RCR-2021-23671214 del Ministero della Salute, è stata sviluppata la versione tablet italiana (I-UDSNB) dell'Uniform Data Set dell' University of Washington's National Alzheimer's Coordinating Center (NACC). La collaborazione del nostro Istituto è stata centrata sullo sviluppo del software e database, e sull'arruolamento dei pazienti per lo sviluppo dei dati normativi italiani.

Partecipazione a convegni

-Simonetta Panerai, Alberto Raggi, Domenica Tasca, Sabrina Musso, Donatella Gelardi, Giuseppina Prestianni, Valentina Catania, Stefano Muratore, e Raffaele Ferri. Telephone-Based Reality Orientation Therapy for Patients With Dementia. 22mo Congresso Nazionale AIP. 24/26 marzo 2022. Firenze. Poster Presentation
-Simonetta Panerai, Alberto Raggi, Domenica Tasca, Sabrina Musso, Donatella Gelardi, Giuseppina Prestianni, Valentina Catania, Stefano Muratore, e

Attività previste Attività 2023:

- prosecuzione dell'arruolamento dei pazienti con m-NCD cui somministrare il software di memoria prospettica.
- in relazione ai trattamenti non farmacologici, si proseguirà con l'applicazione clinica a pazienti con m-NCD e M-NCD, di alcune specifiche procedure, sia ABA che montessoriane. Proseguirà la collaborazione al progetto RehaStart. Si avvierà la prosecuzione della riabilitazione sulle attività di vita quotidiana che i pazienti con M-NCD hanno effettuato tramite VR training durante la fase di ricovero. La riabilitazione proseguirà su tablet con controllo da remoto.

Background: Major Neurocognitive Disorder (M-NCD) or dementia is a clinical disorder characterized by cognitive functions loss and non-cognitive symptoms (affecting emotion, perception, behavior and vegetative functions). Today, the M-NCDs represent a challenge for health systems, doctors, researchers, families and patients, since no preventive measures or treatments exist, able to stop the progression of the disease (Rozzini, Bianchetti, Trabucchi., Edited by, 2014). Regarding the cognitive characteristics, the prospective memory (PM) is a function especially focused in recent years. People with m-NCD show PM performances similar to those exhibited by people with Alzheimer's dementia, therefore PM might represent an early cognitive marker of conversion from m-NCD to M-NCD. The PM requires, for its functioning, the activation of controlled attention. PM in people with m-NCD is currently an open field, because of it is important to clarify the role and the functioning of the attentional processes involved, and to verify whether PM can really constitute an early marker of transition from m- to M-NCD. With reference to non-pharmacological interventions, a wide variety of treatments are currently available (Clare et al., 2004; Alves et al., 2013; Beard, 2012), which have the aim to improving both cognition and quality of life. These treatments do not have undesirable side effects, can improve synaptic plasticity, and can induce structural changes in a long period (Wan and Schlaug, 2010). Many reviews on cognitive interventions conclude that they can delay the dementia onset in people with m-NCD, as well as improve cognitive function and quality of life in both healthy elderly, and people with m-NCD and M-NCD. Currently, cognitive interventions for people with NCD can count on new and very promising technological approaches, such as virtual reality (VR) and telehealth, which appear to be more effective than traditional approaches, producing positive results in a short time as well as improving the brain neuro-plasticity. Currently there are not many studies on the rehabilitation efficacy of VR and telehealth in patients with NCD, but some recent reviews have found mild-moderate effects, especially with the use of semi-immersive devices. The previous experiences carried out in our institute showed that the group cognitive activation approach in place, the g-ICA, produced important changes in the cognitive functioning of patients with m- and M-NCD, as well as in non-cognitive measures, such as quality of life and self-esteem. The work carried out in our VR laboratory focused on the rehabilitation of everyday functional living skills. The results obtained so far, have shown important improvements during VT

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

and spontaneous generalizations to the natural contexts of life.

Hypothesis and Significance: The number of people with dementia is exponentially increasing in recent years. It is therefore urgent to identify possible neuropsychological markers from mild cognitive decline to dementia conditions in order to start the cognitive stimulation treatments as soon as possible, for slowing down the worsening of the disease and ensure a better quality of life for patients and their families. It is therefore very urgent to know the outcomes of the cognitive treatments currently described in the literature, in order to use the most effective ones. It is also important to guarantee the continuation of the cognitive rehabilitation through remote systems and the development and implementation of specific software packages. This might guarantee the necessary continuity to the rehabilitation, and lower costs for the health system.

Specific Aims: The current research project aims: a) to investigate in greater depth the cognitive characteristics of patients with m-NCD and M-NCD, in particular the PM; b) to evaluate the outcomes of different cognitive approaches, carried out in a traditional way or through tele-rehabilitation and VR, through the review of literature studies, as well as their practical applications.

Expected outcomes: a) We expect to find lower than expected PM and attentional performances in patients with m-NCD; b) we expect to receive some useful suggestions about the effectiveness of different cognitive rehabilitation approaches, in order to be put in a position to define personalized programs, based on the specific needs of patients.

Significance and Innovation: a) the results of the PM study may suggest specific indications for the early start of the cognitive neuropsychological rehabilitation in patients with m-NCD, as well as to give indications on which attentional systems it is most necessary to intervene. b) the study and the practical applications of different cognitive approach will allow the development of an integrated and coherent rehabilitation system including rehabilitative sessions inside and outside the hospital, as well as using traditional methods and tele-rehabilitation.

Translational relevance: Since cognitive treatments for dementias are currently included in the Essential Level of Assistance (LEA), an integrated system of cognitive rehabilitation (in presence and remote, to be implemented in hospitals, in dedicated public and private rehabilitation facilities, and in outpatient settings) might be an answer to the current needs of people with dementia or other cognitive problems; moreover, an integrated rehabilitation system might allow to contain the economic expenses faced by the health system.

05 : Studio dell'espressione genica di probabili biomarcatori epigenetici in pazienti con Malattia di Parkinson

Responsabile: L'Episcopo Francesca

Programma:

Parole chiave: parkinson's disease; diagnostic biomarkers; gene expression

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Genes, Genomes and Genetics

Project Classification SS: Molecular Genetics - MGA

Descrizione: Da RNA proveniente da biopsie di cervello di individui malati di Parkinson, per la precisione campioni di striato anteriore, sarà possibile, dopo la conversione in cDNA, lo studio in Real-Time PCR dell'espressione dei geni SIRT1, NRG1, MAPT, BDNF (noti in letteratura per essere differenzialmente espressi nelle malattie neurodegenerative), utilizzando sonde TaqMan. Acquisiti i risultati, si procederà ad effettuare la stessa analisi su cellule del sangue (Buffy Coat) di pazienti arruolati a tale scopo in modo da verificare se esiste una correlazione di espressione genica fra i due tipi di tessuto. Diversi dati in letteratura suggeriscono che questi biomarcatori epigenetici possano essere utili nella pratica clinica per la diagnosi, la sorveglianza e la prognosi dell'attività della malattia nei pazienti con malattie neurodegenerative.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Un aspetto critico della Real-Time PCR è la presenza di geni housekeeping (HKG) come controllo interno per la normalizzazione dei dati di espressione per i geni di interesse. È necessario quindi selezionare HKG corretti nell'indagine delle diverse patologie. In questa prima fase della ricerca, abbiamo analizzato la stabilità di espressione degli HKG nella malattia di Parkinson (PD). Il lavoro è stato svolto su biopsie di cervello, più precisamente di Striato Anteriore, di pazienti deceduti. Da questi tessuti è stato estratto in una prima fase l'RNA totale che successivamente è stato convertito in cDNA.

Su questo materiale genetico, è stata analizzata, in Real-Time PCR l'espressione di 23 sonde costruite su geni noti in letteratura per avere, in linea generale, un'espressione più o meno stabile.

L'analisi statistica è stata fatta utilizzando il programma RefFinder che calcola il punteggio dei geni di riferimento utilizzando gli algoritmi geNorm, Normfinder e BestKeeper; il programma assegna un punteggio appropriato a ciascun gene e calcola la media geometrica dei loro pesi per la classifica finale complessiva. Il programma sceglie il punteggio più basso tra quelli assegnati da ciascun algoritmo separatamente e poi assegna il punteggio complessivo finale. Più il punteggio finale è vicino a 1, più è stabilmente espresso l'HKG considerato.

Si è potuto quindi stabilire che il gene PES1, uno dei geni necessari al processamento dell'RNA ribosomiale (rRNAs), è l'housekeeping con espressione più stabile nello striato anteriore di cervelli dei malati di Parkinson.

Tuttavia, dall'analisi con RefFinder emerge che anche i geni ABL1 (che codifica per una proteina implicata nei processi di differenziazione, divisione e adesione cellulare) e PUM1 (implicato nella traduzione degli mRNA), hanno espressione altrettanto stabile e possono essere ugualmente utilizzati come housekeeping.

Attività previsteAttività 2023:

Sugli stessi campioni di cDNA utilizzati per selezionare l'housekeeping più stabile, si studierà l'espressione dei geni SIRT1, NRG1, MAPT, BDNF (noti in letteratura per essere differenzialmente espressi nelle malattie neurodegenerative), utilizzando sonde TaqMan.

Acquisiti i risultati, si procederà ad effettuare la stessa analisi su cDNA di cellule del sangue (Buffy Coat) di pazienti arruolati a tale scopo in modo da verificare se esiste una correlazione di espressione genica fra i due tipi di tessuto (sangue intero e striato anteriore) e poter eventualmente identificare biomarcatori affidabili che potrebbero aiutare nella diagnosi precoce delle malattie neurodegenerative e fornire informazioni preziose per l'attuazione di un programma di trattamento personalizzato.

Background: Neurodegenerative disorders (NDDs) are major health issues in Western countries and are typically associated with aging. Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) are the most common neurodegenerative disorders worldwide. AD is a progressive disorder that causes the irreversible loss of memory and cognitive function. The main pathological features of AD are neuritic plaques and intracellular neurofibrillary tangles caused by the accumulation of amyloid-beta (Amyloid-beta) peptide and hyperphosphorylated microtubule-associated tau protein, respectively. PD, the second most common neurodegenerative disorder, affects 2% of the population over the age of 60 and is multifactorial with genetic, environmental, cerebrovascular, and epigenetic components. The motor dysfunction observed in clinical PD is due to the progressive loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and the formation and accumulation of Lewy bodies, as well as intracellular inclusions of alfa-synuclein.

Hypothesis and Significance: Epigenetics is the study of reversible heritable changes in gene expression that occur without alterations to the DNA sequence, linking the genome and the environment. The accumulation of various epigenetic alterations over the lifespan may contribute to neurodegenerative and cerebrovascular disorders. DNA methylation, chromatin remodeling/histone modifications, and microRNA (miRNA) regulation are classic epigenetic mechanisms. This mechanism alters DNA stability and accessibility, regulating gene expression. This epigenetic modification promotes gene transcription by facilitating the binding of transcription factors and related enzymatic complexes to DNA.

Specific Aims: The aim of the present study is to identify epigenetic biomarkers for improving diagnostic efficacy in patients with neurodegenerative diseases. The present study is to identify epigenetic biomarkers for improving diagnostic efficacy in patients with neurodegenerative diseases.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Expected outcomes: The variation and / or difference in expression of SIRT1, NRG1, MAPT and BDNF, in the brain and blood cells, could be predictive or indicative of the progress of the disease.

Significance and Innovation: These epigenetic biomarkers may be useful in clinical practical for the diagnosis, surveillance, and prognosis of disease activity in patients with neurodegenerative diseases.

Translational relevance: Blood DNA analysis is a non-invasive and inexpensive method for liquid biopsies, with diagnostic potential. Finding new non-invasive biomarkers for the diagnosis of NDDs would do so be useful in the treatment of these patients. Epigenetic changes are reversible, and measuring the expression of SIRT or BDNF (or other genes) can help doctors monitor patients' treatment responses.

06 : RUOLO DEI MASTOCITI NELLA RESTLESS LEGS SYNDROME (RLS)

Responsabile: L'Episcopo Francesca

Programma:

Parole chiave: mastociti; rls

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Clinical Neuroscience and Neurodegeneration - CNN

Descrizione: Le cellule progenitrici CD34+ saranno isolate e purificate tramite un processo a più fasi. In primo luogo, le cellule mononucleate saranno isolate mediante separazione in gradiente di densità, quindi separate magneticamente utilizzando il kit di selezione CD34 umano.

Le cellule così isolate, saranno seminate in un terreno a base di metilcellulosa privo di siero, integrato con fattore di cellule staminali e IL-3, per due/quattro settimane.

Utilizzando i surnatanti delle colture cellulari (e/o il siero dei prelievi venosi) si vedrà in ELISA l'espressione proteica di eventuali citochine pro/antinfiammatorie, di chemochine e dei mediatori delle reazioni mastocitarie.

Le cellule saranno utilizzate per analisi di Western Blot e Immunostaining per correlare e validare i dati dell'espressione genica con quelli dell'espressione proteica.

Risultati e prodotti conseguiti: Risultati 2022:

La prima fase del progetto è stata dedicata al reclutamento dei pazienti con la Sindrome delle Gambe senza Riposo (RLS). Dal sangue intero è stato prelevato il Buffy Coat contenente le cellule che sono state contate e congelate. Una volta raccolte in numero sufficiente, circa 100 milioni, sono state poolate e le progenitrici CD34+ sono state isolate e purificate utilizzando un metodo di tipo magnetico in grado di isolare solo un fenotipo cellulare specifico.

Le cellule così isolate, sono state seminate in un terreno a base di metilcellulosa privo di siero, integrato con fattore di staminalità (SFC), IL-3, LDL e altri fattori di crescita, e messe in incubatore a CO₂ a 37°C per quattro settimane.

Alla fine di questo periodo di coltura, si sono formate delle piccole colonie di cellule staminali emopoietiche che sono state raccolte e dissociate. Le cellule così ottenute sono state mantenute in coltura per ulteriori settimane cambiando le condizioni e utilizzando il terreno specifico per la proliferazione e il differenziamento delle CD34+ in Mastociti.

Attività previste: Attività 2023:

Le cellule ottenute, saranno caratterizzate utilizzando specifici anticorpi. L'identificazione delle proteasi prodotte dalle MC, in particolare della triptasi, della chimasi e della catepsina G, sarà eseguita nelle varie fasi del differenziamento.

Una volta certi di essere in presenza di mastociti, da essi sarà estratto l'RNA per gli studi di espressione genica in Real Time PCR utilizzando sonde TaqMan specifiche per tutti i geni di nostro interesse.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Le cellule saranno inoltre utilizzate per analisi di Western Blot e Immunostaining per correlare e validare i dati dell'espressione genica con quelli dell'espressione proteica.

Utilizzando i surnatanti delle colture cellulari (e/o il siero dei prelievi venosi) si vedrà in ELISA l'espressione proteica di eventuali citochine pro/antinfiammatorie, di chemochine e dei mediatori delle reazioni mastocitarie.

Il monitoraggio dell'istamina rilasciata dai mastociti verrà condotto tramite l'ausilio di biosensori amperometrici che sfruttano la capacità dell'enzima Diammino ossidasi (DAO) di convertire l'istamina in sottoprodotti, tra i quali annoveriamo l'acqua ossigenata (H₂O₂).

Sarà anche valutata l'attività aerobica o anaerobica dei mastociti tramite l'analisi delle variazioni delle concentrazioni dei componenti del metabolismo energetico.

Background: The etiopathogenetic mechanisms of RLS are still largely unknown; several studies have shown involvement of the structures of the central nervous system, the dopaminergic system and iron metabolism. In recent years, attention has been focused on the association of RLS with inflammatory and autoimmune processes.

The aforementioned inflammatory processes involve the involvement of mast cells, immune cells that originate in the bone marrow, precisely in the hematopoietic stem cells that follow the myeloid germ line; they are located in the connective tissue, especially in the perivascular area, in the peritoneum, in the lung, in the intestine and in the central and peripheral CNS.

Hypothesis and Significance: Recently, the role of mast cells in the Central Nervous System (they are located in the diencephalon) and peripheral systems has been studied more in depth: they are found specifically in the dura mater / meninges of the spinal cord and brain and can cross the blood brain barrier; they are also located in close proximity to the sensory nerve endings and their degranulation can modulate the excitability of nociceptors. Since mast cells are located near vascularization and nerve fibers, degranulation can have a disruptive effect on those cells contributing to vascular dysfunction and neuropathic pain, respectively; moreover, through the release of substance P, they stimulate the sensitive nerve fibers.

Specific Aims: The aim of the study is to demonstrate mast cell involvement in RLS to better understand the etiopathogenesis of this disorder and the possible therapeutic implications that would arise from it.

Expected outcomes: A role of mast cells in neurodegeneration has also recently been hypothesized: neuronal death, synaptic dysfunction, excitotoxicity; they also show an interaction with microglia, neurons and astrocytes. Indeed, recent studies have linked neuroinflammation, in particular the activation of microglia, to the pathogenesis of Parkinson's disease: misfolded alpha-synuclein can activate microglia through different receptors and activate cascades involving NF- κ B and MAPK. These events promote migration, phagocytosis and lymphocyte recruitment by microglia and trigger increased expression of mediators including TNF- α , IL-6 and COX-2, ultimately exacerbating the death of dopaminergic neurons.

Significance and Innovation: As known in the literature, the involvement of dopaminergic transmission in RLS is undoubted, so a similar mechanism could be at the basis of dopaminergic degeneration, if a role of immune and inflammatory processes in the etiopathogenesis of RLS were to be confirmed.

Translational relevance: Understanding the involvement of mast cells in RLS would make it possible to improve the therapies to be administered to patients with RLS.

07 : Ruolo diagnostico e prognostico di markers elettrofisiologici alla stimolazione magnetica transcranica e loro correlati neurochimici nel declino cognitivo e nei disturbi del sonno

Responsabile: Lanza Giuseppe

Programma:

Parole chiave: neurofisiologia clinica; stimolazione magnetica transcranica; neurologia vascolare; declino cognitivo; disturbi del sonno

Altri enti coinvolti: UOS Malattie Cerebrovascolari Acute, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico G. Rodolico-San Marco, Catania - prof.ssa Rita Bella
Servizio di Geriatria, AO per l'Emergenza Cannizzaro, Catania - prof.ssa Manuela Pennisi

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Neural Basis of Psychopathology, Addictions and Sleep Disorders - NPAS

Descrizione: È noto che l'invecchiamento cerebrale, sia normale che patologico, sia accompagnato da modificazioni significative del profilo di eccitabilità corticale alla stimolazione magnetica transcranica (TMS). La TMS è una metodica neurofisiologica non invasiva che, tramite l'erogazione di impulsi magnetici attraverso lo scalpo, è in grado di fornire informazioni in vivo ed in real time sullo stato di eccitabilità dei circuiti cortico-sottocorticali e delle vie neurotrasmettitoriali che ne sono alla base (Rossini PM, et al. 2015). La TMS, applicata alle Neuroscienze cliniche, soprattutto ai disturbi cognitivi ed ai disordini del movimento, ha messo in luce caratteristiche elettrocorticali e neurochimiche relativamente specifiche per i diversi quadri patologici, quali le malattie cerebrovascolari acute e croniche (Lanza, et al. 2017; Cantone, et al. 2020), le patologie neurodegenerative, soprattutto la demenza di Alzheimer (AD) e la malattia di Parkinson (PD) (Di Lazzaro, et al. 2021) ed i disturbi del sonno (Lanza, et al. 2015). Nel PD, i lavori precedenti, sebbene non tutti (Ni, et al. 2013; Udupa, et al. 2016), hanno evidenziato una riduzione sia della inibizione (SICI) che della facilitazione intracorticale (ICF), sin dalle fasi iniziali di malattia (Bares, et al. 2003; Lefaucheur, et al. 2005; Vacherot, et al. 2010; Kacar, et al. 2013; Leon-Sarmiento, et al. 2013). Tuttavia, sebbene ci siano diversi studi di TMS sia nei disturbi del sonno che sui disordini del movimento (ed in particolare sul PD), molto poco è stato pubblicato finora sul disturbo comportamentale in sonno REM (RBD), una parasonnia del sonno REM che molto spesso precede, anche di diversi anni, l'insorgenza di neurodegenerazione, più spesso nell'ambito delle sinucleinopatie (PD ed alcuni parkinsonismi atipici). Pertanto, appare interessante indagare la presenza di eventuali alterazioni precoci della eccitabilità corticale in pazienti con RBD, soprattutto quando il disturbo del sonno non è ancora complicato da segni clinici di sinucleinopatia. L'identificazione di misure TMS correlate ad RBD, in veglia ed in assenza di segni clinici di extrapiramidopatia o di PD conclamato, potrebbe quindi costituire un marker neurofisiologico precoce di neurodegenerazione, con importanti implicazioni diagnostico-terapeutiche. Un protocollo di TMS capace di fornire informazioni dirette sulla funzione dei neurocircuiti colinergici centrali si basa sulla cosiddetta inibizione afferente a breve latenza (short-latency afferent inhibition, SAI) della risposte motorie corticali. In un precedente lavoro di letteratura (Nardone, et al. 2012), la SAI è risultata essere significativamente ridotta in pazienti con RBD rispetto ai controlli, con valori correlati in modo statisticamente significativo ai test neuropsicologici che misurano la memoria episodica verbale e le funzioni esecutive. Questi risultati supportano l'ipotesi dell'esistenza di una disfunzione colinergica in alcuni pazienti con RBD che svilupperanno un declino cognitivo. Similmente, in uno studio successivo (Nardone, et al. 2013), un'alterazione della SAI in pazienti con RBD+PD suggerisce che questo disturbo del sonno possa rivestire un ruolo determinante nella genesi del declino cognitivo nel PD. Tuttavia, sebbene intriganti, questi dati sono stati riportati da un solo gruppo di ricerca e necessitano peraltro di essere integrati da informazioni più esaustive sulle caratteristiche di eccitabilità cortico-sottocorticale e sulle altre vie di neurotrasmissione coinvolte.

Lo stesso dicasi per i disturbi cognitivi associati a malattia cerebrovascolare, oggi classificati all'interno del termine ombrello Vascular Cognitive Impairment (VCI). Lo spettro clinico del VCI, che è considerata la forma più frequente di declino cognitivo nell'anziano (Román et al., 2004; Moorhouse e Rockwood 2008), include la demenza vascolare (VaD), la demenza mista (di tipo degenerativo e vascolare, come AD) ed il mild VCI (mVCI), ovvero un deterioramento cognitivo dovuto a danno vascolare che non raggiunge la soglia per demenza (O'Brien 2003). Al di là del deterioramento cognitivo, a carico soprattutto delle funzioni attentive ed esecutive (Vasquez e Zakzanis 2015), i pazienti con VCI mostrano significative alterazioni comportamentali (soprattutto apatia, rallentamento o agitazione psicomotoria, comportamenti inappropriati, irritabilità) ed alterazioni del tono dell'umore (depressione) (Bella et al., 2010), che correlano negativamente con lo status cognitivo e l'indipendenza funzionale (Gupta et al., 2014). Sebbene l'esatta fisiopatologia alla base del VCI rimanga poco chiara, i risultati su ampi studi di popolazione (Inzitari et al., 2009) suggeriscono che essa potrebbe derivare dalla disconnessione, su base vascolare, di specifici circuiti prefrontali cortico-sottocorticali (De Groot et al., 2000). Ad oggi, tuttavia, le valutazioni cliniche e neuropsicologiche, oltre che l'imaging strutturale e funzionale, sono le uniche a supporto della diagnosi di VaD, mentre la conferma istopatologica richiede l'esame post mortem (Kalaria 2016). Per screenare e diagnosticare precocemente il VCI ed i suoi sottotipi, l'interesse si è recentemente incentrato sull'identificazione di markers precoci di malattia e progressione del VCI. In questo quadro, la valutazione elettrofisiologica del VCI con TMS può fornire spunti utili sia per la diagnosi che il monitoraggio di questi pazienti, nonché per la risposta alla terapia (Vinciguerra et al., 2020; Cantone et al., 2020). In questo contesto, la TMS ha dimostrato la presenza di fenomeni elettrofisiologici e neurochimici comuni tra AD e VaD, che sembrano agire attraverso meccanismi simili seppur diversi, almeno in principio, sia per origine (degenerativa vs. vascolare) che per localizzazione (corticale vs. sottocorticale) (Guerra, et al. 2015). In particolare, VaD e AD condividono le basi elettrofisiologiche, correlate al

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

danno vascolare e alla perdita neuronale, rispettivamente (Guerra et al., 2015). Queste alterazioni potrebbero indurre una riorganizzazione corticale funzionale, consentendo il mantenimento dell'esecuzione e della programmazione motoria nonostante il progressivo declino cognitivo (List et al., 2013). Ad esempio, come per la AD, la riduzione della soglia motoria di eccitabilità (rMT) nella VaD (indice di aumentata eccitabilità corticale), osservata in circa la metà degli studi, potrebbe essere interpretata come segno di alterata funzione glutammatergica, in termini di attività sbilanciata tra non-NMDA e NMDA, a favore del primo (Di Lazzaro et al., 2021). Tuttavia, anche una ridotta inibizione intracorticale dovrebbe essere presa in considerazione, disinibendo così l'output cortico-spinale (Cantone et al., 2014). In accordo, un adeguato balance tra attività GABAergica e glutammatergica è considerata tra i meccanismi protettivi in grado di contrastare l'eccitotossicità (Paula-Lima et al., 2013). Infine, la SAI è risultata mediamente diminuita nella VaD, sebbene con ampia variabilità interindividuale, da risposte notevolmente ridotte fino a valori normali (Nardone et al., 2008).

L'obiettivo principale di questo progetto è pertanto quello di analizzare il comportamento di diversi parametri TMS, ognuno espressione di una via elettrofisiologica specifica e mediato da una via neurochimica precisa, nel declino cognitivo, disordini del movimento e disturbi del sonno rispetto a soggetti sani di controllo di pari età e sesso. Ciò permetterà l'identificazione di eventuali markers precoci di malattia, soprattutto in soggetti ancora senza manifestazioni cliniche conclamate, e di progressione verso la VaD o il PD (come nel caso del mVCI e del RBD, rispettivamente). Inoltre, dalla correlazione tra misure TMS e dati clinico-neuropsicologici e di imaging potrebbero emergere ulteriori findings a significato diagnostico e prognostico, oltre che potenziali targets per interventi terapeutici farmacologici e non farmacologici (quali la TMS ripetitiva).

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Nel corso del 2022, sono stati implementati essenzialmente due filoni all'interno del presente progetto di Ricerca Corrente. Per quanto concerne il primo filone, esitato in una recente pubblicazione (PMID: 35566417), esso si è basato sull'evidenza di una ridotta facilitazione intracorticale (ICF), misura di stimolazione magnetica transcranica (TMS) principalmente mediata dalla neurotrasmissione glutammatergica, osservata nei soggetti con disturbo comportamentale del sonno REM isolato (iRBD) a rischio di fenocconversione in malattia di Parkinson (PD). Tuttavia, un confronto TMS diretto tra iRBD e PD con RBD (PD+RBD) era ancora mancante. Pertanto, la soglia motoria a riposo (rMT), il periodo silente corticale controlaterale (cSP), l'ampiezza e la latenza dei potenziali evocati motori (MEP), l'inibizione intracorticale a breve latenza (SICI) e la facilitazione intracorticale (ICF) sono state registrate dal muscolo primo interosseo dorsale destro di 15 pazienti de novo con iRBD, 15 pazienti de novo con PD+RBD e 15 controlli sani. Sono stati anche valutati l'indice di atonia del sonno REM (RAI), il Mini Mental State Examination (MMSE), la Geriatric Depression Scale (GDS) e la Epworth Sleepiness Scale (ESS). I tre gruppi sono risultati paragonabili per sesso, età, scolarità e, per quanto riguarda i pazienti, durata di RBD e RAI. L'esame neurologico, il MMSE, la ESS e la GDS sono risultati normali sia nei pazienti che nei controlli, mentre la ESS ha ottenuto un punteggio peggiore nel gruppo PD+RBD, sebbene senza differenze rispetto agli altri gruppi all'analisi post hoc. Rispetto ai controlli, entrambi i gruppi di pazienti hanno mostrato un ICF significativamente ridotto, ma senza differenze tra loro. Pertanto, sia gli iRBD che i PD+RBD condividono un ICF ridotto, suggerendo il coinvolgimento della neurotrasmissione glutammatergica sia nei soggetti a rischio di degenerazione (iRBD) che in quelli con sinucleinopatia conclamata (PD+RBD). Per quanto riguarda invece le differenze di sesso nel declino cognitivo vascolare (VCI) a rischio di demenza (manuscript attualmente in re-review), la TMS è stata utilizzata per paragonare per la prima volta l'eccitabilità corticale e le vie di trasmissione sottostanti tra maschi e femmine con VCI lieve. In particolare, 60 pazienti (33 femmine) sono stati sottoposti a valutazione clinica, psicopatologica, funzionale e TMS. Le misure di interesse consistevano in: rMT, ampiezza e latenza dei MEP, cSP, tempo di conduzione motoria centrale (CMCT), incluso il calcolo con la tecnica dell'onda F (CMCT-F), SICI, ICF ed inibizione afferente a breve latenza, a diversi intervalli interstimolo (ISI). I risultati hanno mostrato che maschi e femmine erano paragonabili per età, scolarità, carico vascolare e sintomi neuropsichiatrici. I maschi hanno ottenuto punteggi peggiori nei test cognitivi globali, nel funzionamento esecutivo e nelle scale di indipendenza. La latenza MEP era significativamente più lunga nei maschi, da entrambi i lati, così come il CMCT ed il CMCT-F dall'emisfero sinistro; è stata inoltre riscontrata una SICI ridotta all'ISI di 3 ms dall'emisfero destro. Dopo la correzione per le caratteristiche demografiche e antropometriche, l'effetto del sesso è rimasto statisticamente significativo per la latenza MEP, bilateralmente, così come per il CMCT-F e la SICI. La presenza di diabete, la latenza MEP bilateralmente, il CMCT ed il CMCT-F dall'emisfero destro erano inversamente correlate con la sindrome disesecutiva, mentre nessuna delle misure TMS era correlata con il carico vascolare. In sintesi, abbiamo confermato il profilo cognitivo e lo stato funzionale peggiori dei maschi con VCI lieve rispetto alle femmine ed evidenziato delle modificazioni sesso-specifiche nell'eccitabilità intracorticale e cortico-spinale alla TMS in questa popolazione di pazienti. Ciò indica che alcune misure TMS potrebbero essere potenziali markers di declino cognitivo e target per nuovi farmaci e terapie neuromodulatorie.

Attività previsteAttività 2023:

Per quanto concerne il primo filone di ricerca all'interno del presente progetto di Ricerca Corrente (tecniche di TMS applicate a

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

pazienti con iRBD ed a coloro con PD+RBD), le attività previste per il 2023 prenderanno innanzitutto in considerazione la possibilità di aggiungere un quarto braccio di pazienti, ovvero pazienti affetti da PD ma senza RBD, al fine di chiarire ulteriormente il ruolo dell'RBD nella fenotipizzazione del PD e del "peso" neurofisiologico che l'RBD "isolato" potrebbe avere nella fenotipizzazione in PD. Inoltre, cercheremo di esplorare con maggiore dettaglio gli aspetti di emotività ed affettività dei pazienti (sia con iRBD che con PD+RBD) e della loro eventuale correlazione con le misure TMS di eccitabilità corticale e di plasticità sinaptica. Pertanto, la TMS, insieme ai dati clinici, polisonnografici e neuroradiologici, può fornire ulteriori informazioni sui meccanismi fisiopatologici alla base del coinvolgimento corticale nel PD e nell'RBD, aprendo possibilmente la strada verso target terapeutici innovativi. Sono naturalmente necessari ulteriori studi per confermare se le modificazioni TMS osservate in questa fase correleranno con le manifestazioni cliniche, il decorso della malattia e la risposta al trattamento.

Per quanto concerne infine il secondo filone di ricerca, ovvero lo studio di modificazioni TMS correlate al sesso in pazienti con VCI lieve a rischio di progressione verso la demenza, prevediamo nel 2023 di approfondire ulteriormente il topic attraverso l'analisi delle differenze emisferiche interlato, sia intragruppo (maschi e femmine) che intergruppo (maschi vs. femmine). Inoltre, dato il potenziale impatto sui parametri TMS di eccitabilità e neuroplasticità, le valutazioni future dovrebbero prendere in considerazione anche fattori ormonali legati al sesso (quali la menopausa nelle donne e la disfunzione erettile nell'uomo), così come le possibili differenze dei MEP legate all'invecchiamento nei due sessi.

Background: Both normal and pathological brain aging is known to be associated with significant changes in the profile of cortical excitability to transcranial magnetic (TMS). TMS is a non-invasive neurophysiological technique which, through the application of magnetic impulses through the scalp, is able to provide information in vivo and in real time on the state of excitability of the cortico-subcortical circuits and of the associated neurotransmitter pathways (Rossini PM, et al. 2015). TMS applied to clinical neuroscience, especially to cognitive and movement disorders, has highlighted electro-cortical and neurochemical specific characteristics for different pathological disorders, such as acute and chronic cerebrovascular diseases (Lanza, et al. 2017; Cantone, et al. 2020), neurodegenerative diseases, especially Alzheimer's dementia (AD) and Parkinson's disease (PD) (Di Lazzaro, et al. 2021) and sleep disorders (Lanza, et al. 2015).

In PD, previous works, although not all (Ni, et al. 2013; Udupa, et al. 2016), have shown a reduction in both inhibition (SICI) and intracortical facilitation (ICF), included the initial stages of the disease (Bares, et al. 2003; Lefaucheur, et al. 2005; Vacherot, et al. 2010; Kacar, et al. 2013; Leon-Sarmiento, et al. 2013). However, although several studies are available in movement disorders (and, namely, in PD), very little has been published so far on REM sleep disorder (RBD), a REM sleep parasomnia that very often precedes, even by several years, the onset of neurodegeneration, more often synucleinopathies (PD and some atypical parkinsonisms). Therefore, it is of relevance to investigate the presence of any early alteration of cortical excitability in patients with RBD, especially when the sleep disorder is not yet complicated by clinical signs of synucleinopathy. The identification of specific TMS profile to RBD, in wakefulness and in the absence of clinical signs of parkinsonism or overt PD, could therefore represent an early neurophysiological marker of neurodegeneration, with important diagnostic-therapeutic implications. However, although intriguing, these data have been limited by few research groups and need to be confirmed by further and independent investigations.

The same applies to cognitive disorders associated with cerebrovascular disease, now classified under the umbrella term of Vascular Cognitive Impairment (VCI). The clinical spectrum of VCI, which is considered the most frequent form of cognitive decline in the elderly (Román et al., 2004; Moorhouse and Rockwood 2008), includes vascular dementia (VaD), mixed dementia (degenerative and vascular, such as AD) and mild VCI (mVCI), i.e. cognitive impairment due to vascular damage that does not reach the threshold for dementia (O'Brien 2003). Beyond cognitive deterioration, mainly affecting attentional and executive functions (Vasquez and Zakzani 2015), patients with VCI show significant behavioral alterations (especially apathy, psychomotor slowing or agitation, inappropriate behaviors, irritability) and mood changes (i.e., depression) (Bella et al., 2010), which negatively correlate with cognitive status and functional independence (Gupta et al., 2014). Although the exact pathophysiology underlying VCI remains unclear, results from large population studies (Inzitari et al., 2009) suggest that it may arise from vascular-based disconnection of specific prefrontal cortico-subcortical circuits (De Groot et al., 2000). To date, however, clinical and neuropsychological assessments, as well as structural and functional imaging, are the only tools supporting the diagnosis of VaD, while histopathological confirmation requires post mortem examination (Kalra 2016). To screen and diagnose VCI and its subtypes early, interest has recently focused on identifying early TMS markers of disease and progression.

Hypothesis and Significance: Within movement disorders, to date, the effort to develop neuroprotective strategies for PD has been focused on the early stages of the disease, which offers the best therapeutic opportunities. Among the prodromal markers proposed, the most reliable predictor of PD remains RBD. Therefore, the systematically multidimensional investigation of isolated RBD may pave the way for establishing a battery of prodromal markers for alpha-synucleinopathy, which could lead to maximize therapeutic approaches. Based on clinical

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

neurophysiology-related studies, we hypothesize that isolated RBD may show abnormalities within both the brainstem and the cortex in a similar extent to those already observed in PD, even at early stages. Recently, some data have been already published by using TMS, a neurophysiological technique able to non-invasively probe the excitation state of the motor cortical areas, the conductivity along the cortico-spinal tract, and the level of synaptic plasticity and functional connectivity (Rossini, et al. 2015). In isolated RBD patients, we found that changes in specific TMS measures of MEPs, i.e., ICF and, to a lesser extent, SICl (which are mediated mainly by glutamate and GABA, respectively) might precede the onset of neurodegeneration (Lanza, et al. 2020). Furthermore, SICl correlated with muscle tone alteration, i.e., REM atonia index (RAI), during REM sleep, possibly supporting the RBD model of retrograde influence on the cortex from the brainstem (PMID: Peever, et al. 2014). Therefore, the activity of the brainstem centers might be implicated in the physiological suppression of muscle activity during wakefulness. Conversely, in isolated RBD, an impaired control, arising from the brainstem and ascending to the supratentorial structures, might cause both the reduction of REM sleep atonia and an imbalance between SICl and ICF in favour of the former. Overall, these findings enrich the knowledge on the degree of both brainstem and cortical involvement in RBD and represent the basis for further research in this field, including follow-up studies to assess the progression of clinical and electrophysiological abnormalities. Regarding VCI, the reduction of rMT in VaD, observed in half of the studies, as well as in AD, might be viewed as an electrophysiological hallmark of the impaired glutamatergic circuitry, in terms of an imbalanced activity between non-NMDA and NMDA, in favour of the former (Di Lazzaro et al., 2021). However, a reduced intracortical inhibition should be also taken into account, thus facilitating the cortico-spinal outputs (Cantone et al., 2014). Indeed, the release of GABA secondary to the overactivation of glutamate is considered among the protective mechanisms able to counteract the excitotoxicity (Paula-Lima et al., 2013). Coherently, the studies to date published have not found clear changes of TMS-related measures of inhibition (i.e., CSP and SICl). Conversely, mean SAI was found to be substantially decreased in subcortical VaD, though with wide interindividual variability, ranging from markedly reduced responses to normal values (Nardone et al., 2008). Mean SAI was also decreased in AD and normal in VaD, with the exception of 25% of VaD patients with a probable mixed form of dementia (Di Lazzaro et al., 2008) and those with mild VCI (Bella et al., 2016). Although a similar rearrangement of cortical areas has also been hypothesized in VCI, this has not yet been experimentally demonstrated, and data on the plasticity-related mechanisms involved in degenerative movement disorders (such as PD) and their predictors (such as RBD) are still lacking. In this scenario, non-invasive brain stimulation techniques (such as TMS) are essential in the study and modulation of plasticity and metaplasticity involved in various neurological disorders (Cantone, et al. 2021), which constitutes the core of this project.

- Specific Aims:**
1. To search, in an isolated RBD and mild VCI population, standardized multidimensional biomarkers predictive of conversion into alpha-synucleinopathy and VaD respectively, based on clinical, psycho-cognitive, and neurophysiological techniques. These data will be compared with those obtained from a group of age- sex- and education-matched healthy controls. First, all participants will undergo a comprehensive clinical and neuropsychological evaluation (including the Montreal Cognitive Assessment and the Geriatric Depression Scale-short form), as well as a quantification of subjective sleepiness (by means of the Epworth Sleepiness Scale). Then, neurophysiological outcomes will evaluate both cortical and brainstem activities. Namely, TMS and sleep micro- and macrostructures data will be assessed. Moreover, REM sleep without atonia (RSWA) will be quantified according to validated automated method, i.e., REM sleep Atonia Index (RAI) (Ferri, et al. 2008; Ferri, et al. 2010). Regarding MEPs, patients and controls will perform both single- and paired-pulse TMS protocols and the following measures will be obtained with a figure-of-eight coil from the contralateral First Dorsal Interosseous muscle of the dominant hand (Rossini, et al. 2015): resting motor threshold (rMT), contralateral cortical silent period (cSP), MEP latency and amplitude, central motor conduction time (CMCT), SICl, and ICF.
 2. To multidimensionally compare iRBD and mild VCI patients with those already affected by PD and VaD respectively, in order to provide a comprehensive clinical and instrumental characterization of RBD and its pathophysiological relationship with alpha-synucleinopathy and dementia. To date, indeed, there are no biomarkers that reliably predict phenocconversion of isolated RBD and mild VCI into neurodegenerative disorders, such as PD and VaD respectively. To this end, the above-mentioned clinical and instrumental protocol will be performed also in PD patients (with and without concomitant RBD) and VaD patients. In particular, PD patients will be considered enrollable according to the Movement Disorder Society clinical diagnostic criteria (Postuma, et al. 2015) and the evaluation of motor symptoms will include the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)-part III, the modified Hoehn & Yahr scale, the non-motor symptoms scale for PD, and the UPDRS-part I. All data obtained will be used to correlate clinical, psycho-cognitive, and polysomnographic findings (e.g., RAI) from both isolated RBD and PD groups with those recorded from the neurophysiological investigations proposed. The correlation analysis will be performed weighting the disease duration in order to properly evaluate the prodromal effect. Such a comprehensive and

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

multimodal characterization of RBD, both isolated and within an overt parkinsonian syndrome, will be crucial to increase our knowledge on the pathophysiological process of alpha-synucleinopathy from the prodromal stage and to expand the therapeutic repertoire for both sleep and movement disorders.

3. To identify a specific subgroup of isolated RBD and mild VCI at high risk of conversion into alpha-synucleinopathy and VaD respectively (i.e., the fast converters), e.g., older patients, those with mild cognitive impairment, family history for dementia, autonomic and/or motor symptoms, or specific medication exposure (Postuma, et al. 2015; van der Lier, et al. 2018), in order to verify the sensitivity of the obtained markers in predicting phenoconversion. Namely, in this subpopulation, data collection will be obtained both at baseline and at follow-up (after approximately 18 months). This longitudinal assessment will clarify whether the abnormalities detected at baseline will reliably identify the fast converters RBD and correlate with its progression in alpha-synucleinopathy and VaD.

Expected outcomes: By analyzing multidimensional TMS data, we expect to identify a specific pattern linking iRBD and PD, as well as mild VCI and VaD. By analyzing individual results, we also aim at obtaining experimental evidence, within the isolated RBD and mild VCI groups, of putative prodromal signs of clinical conversion. These results will help to increase the diagnostic sensitivity and prognostic insights. By combining different data, we also expect to identify a correlation with multidimensional results. At the TMS level, we expect a neurophysiological imbalance between intracortical facilitatory and inhibitory microcircuits in iRBD, that might reflect the involvement of glutamate and GABA transmission, respectively, in RBD pathophysiology, even in the absence of an overt extrapyramidal syndrome. The analysis of longitudinal data is expected to show significant signs of degeneration within the isolated RBD subgroup, thus allowing a specific identification of subjects who will likely evolve in PD. These integrated findings are expected to provide relevant insights to a deeper understand of isolated RBD process and progression, otherwise not achievable when looking at those data individually and by using single diagnostic approach. The same holds true for VCI and its subtypes: to date, indeed, the exact relationship between cognitive functioning, motor cortical excitability, and synaptic plasticity in VCI is not completely unveiled. In this project, we will provide a timely translational perspective on how cortical excitability and network connectivity interact to determine the pathophysiology and plastic changes in VCI and its subtypes, and how these findings may be exploited by experimental treatments. As an umbrella term encompassing any degree of vascular-related cognitive decline, VCI is deemed to be the most common cognitive disorder in the elderly, with a significant impact on social and healthcare expenses. Interestingly, some of the electrophysiological abnormalities detected in VCI might correlate with disease process and progression, eventually promoting an adaptive plasticity in some patients and a maladaptive, dysfunctional response in others. However, the exact relationships between vascular lesion, cognition, and neuroplasticity are not completely understood. In these patients, we expect to identify a panel of markers able to predict cognitive deterioration in the so-called brain at risk for vascular or mixed dementia. This will be of pivotal importance when designing trials of disease-modifying drugs or non-pharmacological approaches, including non-invasive neuromodulatory techniques (such as those based on repetitive TMS). Taken together, these advances would make VCI a potentially preventable cause of both vascular and degenerative dementia in late life.

Significance and Innovation: The challenge of an early PD and VaD diagnosis limits the optimal temporal window for pharmacological and rehabilitative approaches. In PD, several non-motor symptoms can precede, often by many years, the onset of the disease. Among them, RBD is an ideal candidate for the understanding of PD pathophysiology. This project, by using an innovative non-invasive multimodal approach, will assess and monitor clinical-cognitive, neuroradiological, and electrophysiological correlates of isolated RBD. This would allow an early recognition of a neurodegenerative disease and open new evidence-based therapeutic avenues for both RBD and movement disorders. The longitudinal evaluation will verify whether the abnormalities detected at this stage correlate with the clinical progression of RBD. The combination of diagnostic clues from different techniques into a unified integrated framework will provide a prodromal footprint of PD, thus allowing clinicians to enhance their diagnostic and therapeutic repertoire. At this stage, it is not certain that the findings we may obtain will have a direct impact in the daily decision-making algorithm of these patients, although TMS can help to screen populations at risk. This may be particularly true for VCI patients at risk for VaD: once the population at risk is identified, a careful prevention and vascular risk factors control can be achieved more easily. Further longitudinal studies combining TMS with other neurophysiological techniques, such as high-density EEG and multimodal evoked potentials, as well as with advanced structural and functional neuroimaging (such as diffusion tensor imaging and functional MRI) and serum or CSF analysis will clarify the impact of cognitive and mood deficits on VCI plasticity. Overall, this will clarify the relationship between cognitive functioning, cortical excitability, and synaptic plasticity in dementia. As such, in different cognitive disorders, including VCI, TMS can be exploited as a non-invasive tool able to evaluate in vivo the cortical excitability, the propensity to undergo neural plastic phenomena, and the underlying transmission pathways. Overall, since TMS in VCI has revealed

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

enhanced cortical excitability and synaptic plasticity that seem to correlate with the disease process and progression, in some patients such plasticity may be considered as an adaptive response to disease progression, thus allowing the preservation of motor programming and execution. Recent findings also point out the possibility to employ TMS to predict cognitive deterioration in the so-called "brains at risk" for dementia, which may be those patients who benefit more of disease-modifying drugs and rehabilitative or neuromodulatory approaches, such as those based on repetitive TMS (rTMS). Finally, the results from this project can be exploited to select the responders to specific drugs in the attempt to maximize the response and to restore maladaptive plasticity. Taken together, while no single TMS index owns enough specificity both in cognitive and movement disorders, a panel of TMS-derived measures can support diagnosis and identify early markers of clinical progression.

Translational relevance: The identification of multidimensional markers in isolated RBD and mild VCI will open an exciting window into early diagnosis and novel treatment that can be transferred into daily clinical practice. Based on a customized design, this project will provide clinical, psycho-cognitive, neuroradiological, and electrophysiological findings with an immediate translational value in terms of implementation of pharmacological (i.e. neuroprotective drugs) and non-pharmacological treatment (i.e., cognitive stimulation; non-invasive brain stimulation techniques) of both cognitive and movement disorders. Given the significant epidemiological impact of PD (239/100,000 of prevalence in Italy, with a incidence of newly diagnosed patients of 22/100,000/year) and taking into consideration that such rates increase steadily until the age of 75-84 years due to the population ageing in the next 20 years, this project and related longitudinal investigation are warranted to adequately face the significant health and social costs of PD patients. Overall, there is a mounting interest towards new diagnostic and therapeutic tools for cognitive assessment and rehabilitation in dementia, including VCI. Accordingly, current data, although obtained from heterogeneous studies, have revealed that TMS and rTMS can provide, respectively, valuable diagnostic clues and induce beneficial effects on some cognitive domains and neuropsychiatric manifestations. Challenges still exist in terms of appropriate patient selection and optimization of the stimulation protocols. However, recent findings from animal models are exciting, although their clinical significance needs to be validated. Together with the clinical exam, psychocognitive assessment, and neuroimaging, a systematic TMS evaluation of RBD and VCI patients can aid the diagnostic process, enhance the therapeutic arsenal, and predict the prognosis. To date, indeed, the prediction of dementia onset and progression is beyond the possibilities of conventional tools. However, differently from AD and other degenerative disorders, VaD can be slowed, delayed, or even avoided through a careful prevention and control of vascular risk factors. Besides the prevention of vascular accidents, maintaining the functional status in the elderly is a further key factor in the prevention and management of VCI. Because VCI is a heterogeneous construct, the selection of appropriate outcome measures to employ in pharmacological trials is of particular importance. In this context, the early discovery of new therapeutic targets would lead to a better prevention and treatment of VaD, and accordingly with the reviewed literature, TMS can be of help. An enhancement of cortical plasticity might be induced to counteract cognitive decline, and the evaluation of where and how much this happens in different patients' subpopulations may shed light on the pathophysiological bases of decline or preservation of cognition. Although a single TMS measure cannot be used to diagnose PD or VaD, collectively the parameters of interest may act as footprints of their pathophysiology. Moreover, TMS can help to identify different profiles of cortical excitability for RBD and VCI subtypes and for the prediction of the "brain at risk" to convert into an overt PD and VaD, respectively. These findings will also support the study design of trials to test new drugs and novel non-pharmacological approaches. Finally, clinicians can exploit TMS in patients with overt PD or dementia for the selection of the response to specific drugs, and the efficacy of treatment can be maximized by selecting the patients on the basis of putative neurophysiological markers.

08 : I disturbi del sonno: aspetti clinici, neurobiologici e neurofisiologici

Responsabile: FERRI RAFFAELE

Programma:

Parole chiave: Sleep; REM sleep behavior disorder; restless legs syndrome; periodic limb movements in sleep; parasomnia; insomnia; circadian rhythm disorder; sleep movement disorder; sleep breathing disorders

Altri enti coinvolti: Varie UO nazionali ed internazionali.

Anno inizio: 2022

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Neural Basis of Psychopathology, Addictions and Sleep Disorders - NPAS

Descrizione: Con questo ampio progetto corrente si prevede di continuare ad affrontare i diversi tipi di disordini del sonno sopra descritti e che si trovano molto frequentemente nei pazienti seguiti presso il nostro IRCCS. I nuovi studi proseguiranno i precedenti, in un susseguirsi logico e coerente di analisi osservazionali e talvolta interventistiche. Il focus sarà ancora particolarmente rivolto alle specifiche categorie di disordini già descritte, ma non escluderà l'individuazione di nuovi ambiti di analisi e ricerca, in connessione con le patologie con cui ci troviamo di fronte nella routine clinica. In linea con il recente passato, è prevista un'ampia produzione scientifica in termini di articoli pubblicati su riviste internazionali peer-reviewed e con IF negli alti quartili delle rispettive categorie.

Risultati e prodotti conseguiti Risultati 2022:

Questo progetto ha prodotto i seguenti articoli scientifici:

Italia M, Danani A, Dercole F, Ferri R, Manconi M. A calibrated model with a single generator simulating polysomnographically recorded periodic leg movements. *Journal of Sleep Research* 2022

Ferri R, Schenck CH. Assessing the performance of quantified rapid eye movement sleep without atonia methods for the diagnosis of rapid eye movement sleep behavior disorder: a dog biting its tail. *Sleep* 2022, vol. 45, issue 9.

Proserpio P, Biggio G, Ferri R, et al., Arnaldi D. Insomnia in primary care: a survey conducted on Italian patients older than 50 years: results from the "Sonno e Salute" study. *Neurological Sciences* 2022

Ferri R, Sparasci D, et al., Manconi M. Leg movement activity during sleep in multiple sclerosis with and without restless legs syndrome. *Journal of clinical sleep medicine* Jan 1 2022

Spruyt k, Ferri R. Objective or subjective test? The answer lies in its psychometric property! *Sleep* 2022 vol. 45, issue 10.

Puligheddu M, Figorilli M, et al., Ferri R, et al. Plazzi G, the FARPRESTO Consortium. Predictive risk factors of phenoconversion in idiopathic REM sleep behavior disorder: the Italian study "FARPRESTO". *Neurol Sci* 2022

Khachatryan SG, Ferri R, Fulda S, Garcia-Borreguero D, Manconi M, Muntean ML, Stefani A. Restless legs syndrome: Over 50 years of European contribution. *Journal of Sleep Research* 2022, vol. 31, issue 4.

Raggi A, Mogavero MP, DelRosso LM, Ferri R. Clonazepam for the management of sleep disorders. *Neurological Sciences* 2022.

Attività previste Attività 2023:

La ricerca di base e clinica dell'ultimo decennio ha indubbiamente indicato che, tra le funzioni del sonno, la più importante è quella della protezione e ricostituzione della plasticità del SNC, essenziale per un corretto funzionamento cognitivo dell'uomo. Tutti i disturbi del sonno sono potenzialmente e praticamente in grado di interferire con le varie e complesse funzioni cognitive in modo più o meno significativo, a seconda della loro gravità, ma invariabilmente. Lo scopo di questo ampio progetto è quello di affrontare diversi tipi di disturbi del sonno, riscontrabili molto frequentemente nei pazienti appartenenti al nostro IRCCS, in una successione logica e coerente di analisi osservazionali e talvolta interventistiche. L'attenzione è rivolta in particolare ad alcune categorie di disturbi, ma non esclude l'individuazione di nuovi ambiti di analisi e ricerca, in connessione con le patologie con cui ci troviamo di fronte nella routine clinica. Di primaria importanza, in questo quadro generale, sono gli studi volti a migliorare la diagnosi clinica e polisomnografica del disturbo comportamentale del sonno REM (RBD) e ad identificare eventuali nuovi meccanismi fisiopatologici per aiutare a chiarirne le cause e gli interventi possibili. L'importanza di questa parasonnia del sonno REM sta soprattutto nel suo ormai certo ruolo prodromico per lo sviluppo, dopo anni o addirittura decenni, di una condizione neurodegenerativa progressiva, soprattutto del gruppo delle sinucleinopatie (m. di Parkinson, m. con corpi Lewy, atrofia multisistemica). Un altro tema di ricerca di primaria importanza per il nostro gruppo è quello dei disordini del movimento in sonno (sindrome delle gambe senza riposo o RLS e movimenti periodici degli arti nel sonno o PLMS, come focus principale ma non esclusivo). Oltre alle conseguenze generali sopra menzionate sull'attenzione e sulle capacità cognitive dei pazienti affetti, come effetto della destrutturazione del sonno notturno, negli ultimi anni sono emersi i sospetti di un ruolo di queste condizioni come fattori di rischio per lo sviluppo a lungo termine di disordini cardio- e cerebrovascolari che stanno ricevendo un sostegno crescente dalla ricerca clinica ed epidemiologica, nonché da altri studi che ne analizzano i meccanismi, a partire dalla frammentazione del sonno e dai cambiamenti autonomici associati. Un altro disturbo che è oggetto di particolare attenzione nella nostra attività di ricerca è la narcolessia, una condizione rara caratterizzata, oltre ad altri sintomi specifici, da importanti sonnolenza diurna e attacchi di sonno che incidono significativamente sull'attività diurna dei pazienti, con condizionamenti

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

molto pesanti nei settori dell'istruzione, del lavoro, della famiglia e della società. Di non secondaria importanza, in questo progetto, è l'attenzione rivolta all'insonnia e ai disturbi del ritmo circadiano che, oltre alle conseguenze generali descritte sopra sulle capacità di attenzione e memoria, sono anch'essi riconosciuti fattori di rischio (a lungo termine) di importanti conseguenze cardio- e cerebrovascolari. Infine, l'epidemiologia dei disturbi respiratori del sonno (e delle apnee ostruttive del sonno o OSAS in particolare) ci obbliga quasi ad occuparci anche di questa condizione il cui trattamento è prevalentemente pneumologico, ma anche ortodontico e, talvolta, chirurgico, per le sue profonde conseguenze cognitive e sull'attenzione, ma anche per l'elevata frequenza con cui tale condizione favorisce la comparsa di una costellazione di patologie, anche sistemiche, e cerebrovascolopatie in particolare. Inoltre, associandosi frequentemente alla patologia dementigena dell'anziano, aggrava il quadro che può essere alleviato da un tempestivo riconoscimento e da un trattamento efficace.

Background: The basic and clinical research of the last decade has undoubtedly indicated that, among the functions of sleep, the most important is the protection and reconstitution of the plasticity of the CNS, essential for a correct cognitive functioning of human being. All sleep disorders are potentially and practically able to interfere with different and complex cognitive functions in a more or less significant way, depending on the severity, but constantly.

Hypothesis and Significance: The detailed knowledge of the clinical, neurophysiological, and biological aspects of the main sleep disorder categories of adult and elderly people is a primary step for their better early diagnosis, prevention and treatment. The results of this project will provide essential pieces of information, potentially able to modify the current approaches.

Specific Aims: The purpose of this large project is to address different types of sleep disorders, very frequently found in patients belonging to our IRCCS, in a logical and coherent sequence of observational and sometimes interventional studies. The focus is particularly on some categories of disorders, but does not exclude the identification of new areas of analysis and research, in connection with the diseases with which we compare ourselves in the clinical routine.

Expected outcomes: Better comprehension of the complex phenomenology of specific sleep disorders including but not limited to REM sleep behavior disorder, restless legs syndrome, narcolepsy, insomnia, sleep apnea. Identification of novel markers for their diagnosis, novel approaches for their treatment and advanced strategies for their management.

Significance and Innovation: In several instances, we use innovative methods for the quantification of abnormalities characterizing each disorder which are then proposed to the scientific world as new solutions for the diagnosis and follow-up of the disorders. As examples, we list here the Periodicity Index proposed by us for a more accurate identification of periodic leg movements during sleep which has led to profound changes into the current international standard criteria for their scoring. Another example is the REM Atonia Index, a completely automatic computer-based quantification of REM sleep without atonia in patients with REM sleep behavior disorder that we have also shown recently to be able to pick up efficiently subjects without RBD but with a "subclinical" motor discontrol during REM sleep, that now needs to be monitored for its potential development into fully blown REM sleep behavior disorder. We mention here also the "Misperception index" that allows, for the first time, to define quantitatively and reliably an otherwise elusive condition known as paradoxical insomnia.

Translational relevance: All the studies running under this project carry an important load of translational value because the results obtained, when confirmed, can directly be included in the decisional processes characterizing an expert and updated clinical practice.

09 : Studio osservazionale degli aspetti clinici, neurofisiologici, patologici e molecolari di pazienti con disturbi neurocognitivi e neurologici

Responsabile: FERRI RAFFAELE

Programma:

Parole chiave: Neurocognitive disorders (NCD); Mild Cognitive Impairment (MCI); Alzheimer's disease (AD); Parkinson's disease (PD); Lewy body dementia (DLB); cognitive decline

Altri enti coinvolti: Diverse strutture di ricerca nazionali ed internazionali.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Clinical Neuroscience and Neurodegeneration - CNN

Descrizione: In questo progetto si procederà a raccogliere, anche retrospettivamente, dati clinici, neurofisiologici, patologici e molecolari, raccolti routinariamente per motivi clinici, di pazienti con disturbi neurocognitivi e/o neurologici, ricoverati presso il nostro IRCCS, per utilizzarli per studi osservazionali finalizzati alla segnalazione nuove scoperte che puntano ad aspetti particolari che necessitano di chiarimenti o per portare nuove idee sulla gestione delle malattie non trasmissibili e dei disturbi neurologici nei pazienti adulti.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Sono stati pubblicati i seguenti articoli scientifici:

Grazzini M, Godani M, Grisanti S, Benedetti L, Lanza G. Acute cerebellar ataxia and myoclonus (ACAM) in SARS-CoV-2-related 2 encephalopathy responsive to immunotherapy: a case series. "Movement Disorders Clinical Practice 2022

Giuffrè M, Gazzin S, Zoratti C, Llido JP, Lanza G, Tiribelli C, Moretti R. Celiac disease and neurological manifestations: from gluten to neuroinflammation. Int J Mol Sci

Mansueto G, Lanza G, Fiscaro F, Alaoui D, Hong E, Girolami S, Montella M, Feola A, Di Napoli M. Central and Peripheral Nervous System Complications of Vasculitis Syndromes From Pathology to Bedside: Part 1-Central Nervous System. Curr Neurol Neurosci Rep. 2022 Jan;22(1):47-69. doi: 10.1007/s11910-022-01172-z

Fiscaro F, Lanza G, et al., Bella R. Cerebral hemodynamic changes to transcranial Doppler sonography in celiac disease: A pilot study. Front Hum Neurosci 2022

Fiscaro F, Lanza G, Pennisi M, Vagli C, Cantone M, Falzone L, Pennisi G, Ferri R, Bella R. Daily mocha coffee intake and psycho-cognitive status in non-demented non-smokers subjects with subcortical ischemic vascular disease. International Journal of Food Sciences and Nutrition

Monte MA, Veroux M, Rodolico MS, Losi V, Di Pino L, Bella R, Lanza G, Monte IP. Fabry's disease: the utility of a Multidisciplinary Screening Approach. Life 2022

Godani M, Beronio A, Lanza G. Post-COVID-19 myoclonus-ataxia syndrome responsive to intravenous immunoglobulins. Mov Dis Clin Pract 2022

Polašek O, Wazny K, Adeloye D, et al., Lanza G, Lee SW, Li Y, et al., Rudan I. Research priorities to reduce the impact of COVID-19 in low- and middle-income countries. J Glob Health. 2022 Apr 15;12:09003. doi: 10.7189/jogh.12.09003

Attività previsteAttività 2023:

Il termine disturbo neurocognitivo del DSM-V si riferisce a un'ampia gamma di disturbi che colpiscono il cervello, precedentemente definiti \demenza\. Tutti i disturbi neurocognitivi (NCD) presentano \un declino cognitivo acquisito in uno o più domini\. Questi disturbi tendono a coinvolgere problemi di memoria, pensiero, ragionamento e risoluzione dei problemi. Il NCD più conosciuto è la malattia di Alzheimer (AD) e alcuni tipi, come la malattia di Parkinson, possono portare a disabilità fisiche. Esistono disturbi neurocognitivi maggiori e lievi (NCD), a seconda di quanto gravemente i sintomi influiscono sulla capacità di una persona di funzionare in modo indipendente nelle attività quotidiane. La distinzione chiave tra disturbo neurocognitivo maggiore e lieve è che gli individui con disturbo neurocognitivo maggiore sperimentano un sostanziale declino della funzione che include una perdita di indipendenza a causa di un profondo deterioramento cognitivo, mentre gli individui con disturbo neurocognitivo lieve sperimentano solo un modesto declino cognitivo e, di conseguenza, funzionano in modo relativamente indipendente. I disturbi neurocognitivi si verificano più comunemente negli anziani, ma possono colpire anche i più giovani. La ridotta capacità cognitiva può includere problemi di attenzione complessa, funzionamento esecutivo, apprendimento e memoria, linguaggio espressivo e ricettivo, capacità percettivo-motorie, cambiamenti nel comportamento e difficoltà nello svolgere le attività quotidiane. Questi sintomi possono essere causati da una condizione neurodegenerativa, come la m. di Alzheimer, la demenza, la demenza frontotemporale o la malattia a corpi di Lewy. Possono anche essere causati da malattie come la malattia di Parkinson o la malattia di Huntington, o lesioni cerebrali traumatiche o ictus. I disturbi neurocognitivi possono anche svilupparsi a causa dell'abuso di sostanze o dell'infezione da HIV. I fattori alla base di diversi tipi di disturbo neurocognitivo includono condizioni metaboliche ed endocrine, carenze nutrizionali, abuso di sostanze, traumi e infezioni. Questo progetto mira a raccogliere, anche retrospettivamente, dati clinici, neurofisiologici, patologici e molecolari, raccolti

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

routinariamente per motivi clinici, di pazienti con disturbi neurocognitivi e/o neurologici, ricoverati presso il nostro IRCCS, per utilizzarli per studi osservazionali finalizzati alla segnalazione nuove scoperte che puntano ad aspetti particolari che necessitano di chiarimenti o per portare nuove idee sulla gestione delle malattie non trasmissibili e dei disturbi neurologici nei pazienti adulti.

Attività 2022:

Il termine disturbo neurocognitivo del DSM-V si riferisce a un'ampia gamma di disturbi che colpiscono il cervello, precedentemente definiti "demenza". Tutti i disturbi neurocognitivi (NCD) presentano un declino cognitivo acquisito in uno o più domini. Questi disturbi tendono a coinvolgere problemi di memoria, pensiero, ragionamento e risoluzione dei problemi. Il NCD più conosciuto è la malattia di Alzheimer (AD) e alcuni tipi, come la malattia di Parkinson, possono portare a disabilità fisiche. Esistono disturbi neurocognitivi maggiori e lievi (NCD), a seconda di quanto gravemente i sintomi influiscono sulla capacità di una persona di funzionare in modo indipendente nelle attività quotidiane. La distinzione chiave tra disturbo neurocognitivo maggiore e lieve è che gli individui con disturbo neurocognitivo maggiore sperimentano un sostanziale declino della funzione che include una perdita di indipendenza a causa di un profondo deterioramento cognitivo, mentre gli individui con disturbo neurocognitivo lieve sperimentano solo un modesto declino cognitivo e, di conseguenza, funzionano in modo relativamente indipendente. I disturbi neurocognitivi si verificano più comunemente negli anziani, ma possono colpire anche i più giovani. La ridotta capacità cognitiva può includere problemi di attenzione complessa, funzionamento esecutivo, apprendimento e memoria, linguaggio espressivo e ricettivo, capacità percettivo-motorie, cambiamenti nel comportamento e difficoltà nello svolgere le attività quotidiane. Questi sintomi possono essere causati da una condizione neurodegenerativa, come la m. di Alzheimer, la demenza, la demenza frontotemporale o la malattia a corpi di Lewy. Possono anche essere causati da malattie come la malattia di Parkinson o la malattia di Huntington, o lesioni cerebrali traumatiche o ictus. I disturbi neurocognitivi possono anche svilupparsi a causa dell'abuso di sostanze o dell'infezione da HIV. I fattori alla base di diversi tipi di disturbo neurocognitivo includono condizioni metaboliche ed endocrine, carenze nutrizionali, abuso di sostanze, traumi e infezioni. Questo progetto mira a raccogliere, anche retrospettivamente, dati clinici, neurofisiologici, patologici e molecolari, raccolti routinariamente per motivi clinici, di pazienti con disturbi neurocognitivi e/o neurologici, ricoverati presso il nostro IRCCS, per utilizzarli per studi osservazionali finalizzati alla segnalazione nuove scoperte che puntano ad aspetti particolari che necessitano di chiarimenti o per portare nuove idee sulla gestione delle malattie non trasmissibili e dei disturbi neurologici nei pazienti adulti.

Background: Neurocognitive disorders most commonly occur in older adults, but they can affect younger people as well. Reduced cognitive capacity may include problems with complex attention, executive functioning, learning and memory, expressive and receptive language, perceptual-motor abilities, changes in behavior, and trouble performing everyday tasks. Several aspects related to these conditions remain to be clarified in order to improve the current knowledge, prevention and management.

Hypothesis and Significance: "This project aims at collecting, also retrospectively, clinical, neurophysiological, pathological and molecular data, routinely collected for clinical reasons, of patients with neurocognitive and/or neurological disorders, admitted to our IRCCS."

Specific Aims: This project wants to produce observational studies aimed at reporting new findings pointing at particular aspects in need of clarification or at bringing new ideas on the management of NCDs and neurological disorders in adult patients.

Expected outcomes: We expect to be able to communicate to the scientific community novel data by analytically assess clinical, neurophysiological, pathological and molecular findings in single cases or case series collected among patients with neurocognitive and/or neurological disorders, admitted to our IRCCS.

Significance and Innovation: a) To identify and analyze clinical, neurophysiological, pathological and molecular features of patients with neurocognitive and/or neurological disorders. b) To provide possible hints for a better management of neurocognitive and/or neurological disorders in adults.

Translational relevance: All data produced by this project will have a potential impact on the programming of management strategies of neurocognitive and/or neurological disorders in adults.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

di Alzheimer (AD)

Responsabile: FERRI RAFFAELE

Programma:

Parole chiave: Elettroencefalografia (EEG); Mild Cognitive Impairment (MCI); malattia di Alzheimer (AD); malattia di Parkinson (PD); demenza a corpi di Lewy (DLB); declino cognitivo; analisi spettrale; Low Resolution Brain Electromagnetic Tomography (LORETA); accoppiamento funzionale; coerenza spettrale; directed transfer function (DTF); imaging del tensore di diffusione (DTI); trattografia; classificazione matematica computerizzata (CAD); rete neurale artificiale (ANN); support vector machine (SVM)

Altri enti coinvolti: Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Erspamer", Sapienza Università di Roma, Roma. Diverse strutture di ricerca Nazionali ed Internazionali.

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Clinical Neuroscience and Neurodegeneration - CNN

Descrizione: 1. Vogliamo migliorare il valore informativo clinico di marcatori quantitativi EEG della connettività funzionale corticale nel corso della malattia di Alzheimer, di Parkinson e a Corpi di Lewy, anche usando procedure avanzate di machine learning. 2. Vogliamo approfondire l'impatto della riserva cognitiva, del sesso e dell'età sui meccanismi neurofisiologici che regolano la vigilanza nelle fasi prodromiche della malattia di Alzheimer, di Parkinson e a Corpi di Lewy. 3. Vogliamo ulteriormente sviluppare le tecnologie di telemonitoraggio e di telemedicina nella valutazione e il training delle funzioni cognitive nei pazienti con malattia di Alzheimer, di Parkinson e a Corpi di Lewy.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Sono stati pubblicati i seguenti lavori scientifici:

Babiloni C, Noce G, Di Bonaventura C, Lizio R, Eldellaa A, Tucci F, Salamone EM, Ferri R, Soricelli A, Nobili F, Famà F, Arnaldi D, Palma E, Cifelli P, Marizzoni M, Stocchi F, Bruno G, Di Gennaro G, Frisoni GB, Del Percio C. Alzheimer's disease with epileptiform EEG activity: Abnormal cortical sources of resting-state delta rhythms in patients with amnesic mild cognitive impairment J Alz Dis 2022

Babiloni c, Del Percio C, et al., Ferri R, Lorenzo I, et al., Angarano G. Parietal intrahemispheric source connectivity of resting-state electroencephalographic alpha rhythms is abnormal in Naïve HIV patients. Brain Research Bulletin 2022, vol. 181, p. 129-143.

Babiloni C, Lorenzo I, Lizio R, Lopez S, Tucci F, Ferri R, Soricelli A, Nobili F, Arnaldi D, Famà F, Buttinelli C, Giubilei F, Cipollini V, Onofrij M, Stocchi F, Vacca L, Fuhr P, Gschwandtner U, Ransmayr G, Aarsland D, Parnetti L, Marizzoni M, D'Antonio F, De Lena C, Güntekin B, Yıldırım E, Hanoğlu L, Yener G, Gündüz DH, Taylor JP, Schumacher J, McKeith I, Frisoni GB, De Pandis MF, Bonanni L, Del Percio C, Noce G. Reactivity of posterior cortical electroencephalographic alpha rhythms during eyes opening in cognitively intact older adults and patients with dementia due to Alzheimer's and Lewy Body Diseases. Neurobiol Aging 2022; in press.

Attività previsteAttività 2023:

In Italia vi sono 600.000 anziani con la demenza d'Alzheimer (AD), dovuta a processi neurodegenerativi. Il processo neurodegenerativo dell'AD si sviluppa per diversi anni senza manifestazioni di declino cognitivo (fase preclinica). Poi per alcuni anni si manifesta un obiettivo declino cognitivo lieve (mild cognitive impairment - MCI, AD prodromico) che dopo alcuni anni ancora progredisce in un grave deficit cognitivo e nella perdita di autonomia funzionale, la demenza di Alzheimer. Numerosi sono gli studi che hanno investigato la condizione di MCI con deficit di memoria (MCI amnesico). Vi è, infatti, un crescente consenso sull'idea che un MCI amnesico possa essere un AD prodromico, quando il deficit cognitivo si accompagna a biomarker patofisiologici dell'AD (Dubois et al., 2014, Lancet Neurology), sulla base dell'elevata percentuale di casi che in un anno progrediscono dalla condizione di MCI a quella di AD. Tuttavia, una percentuale significativa di soggetti con MCI non progredisce alla condizione di AD. In base a questi dati, l'identificazione precoce di pazienti MCI con elevata possibilità di progressione nell'AD, tramite uno o più biomarker non invasivi ed economici di diagnosi precoce, potrebbe essere cruciale per avviare interventi riabilitativi o farmacologici volti a rallentare la progressione dei deficit cognitivi e l'insorgenza della disabilità.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Per diagnosticare l'AD nella sua fase preclinica o prodromica sono state sviluppate indagini strumentali che producono biomarker quali l'esame delle proteine A β 42 e tau nel liquor, la volumetria dell'ippocampo e della corteccia cerebrale mediante MRI, la valutazione del metabolismo cerebrale e dell'accumulo di A β 42 mediante PET. Si tratta di tecniche di indagine complesse e costose, in alcuni casi invasive, suggerite dalle linee guida internazionali quando vi è un fondato sospetto di AD o di disturbo cerebrovascolare ma è irrealistico pensare di applicarle su larga scala in una popolazione così vasta come quella degli anziani a rischio di declino cognitivo. L'EEG registrato a riposo ad occhi chiusi e occhi aperti (rsEEG) rappresenta una procedura non invasiva, facilmente disponibile e poco costosa, adatta per essere applicata su larga scala su soggetti anziani con deficit cognitivi (non implicando troppa collaborazione da parte del soggetto o stati prolungati di immobilizzazione completa). Numerosi sono stati gli studi del nostro gruppo di ricerca su pazienti con demenza e MCI dovuto a AD, malattia di Parkinson (PDD) e malattia a corpi di Lewy (DLB) che hanno evidenziato come il nostro approccio basato sullo studio delle sorgenti EEG sia un utile a descrivere le anomalie dei meccanismi neurofisiologici oscillatori alla base della regolazione della vigilanza nei suddetti processi neuro-degenerativi.

Background: In Italy, there are 600,000 elderly people with Alzheimer's dementia (AD), due to neurodegenerative processes. The neurodegenerative process of AD develops for several years without manifestations of cognitive decline (preclinical phase). Then for a few years, a mild cognitive impairment (MCI, prodromal AD) is manifested, which after a few more years progresses into a severe cognitive impairment and loss of functional autonomy, Alzheimer's dementia. Numerous studies have investigated the condition of MCI with memory impairment (amnestic MCI). There is, in fact, a growing consensus on the idea that amnestic MCI may be prodromal AD, when cognitive impairment is accompanied by pathophysiological biomarkers of AD (Dubois et al., 2014, Lancet Neurology), based on the high percentage of cases that progress from MCI to AD status in one year. However, a significant percentage of individuals with MCI do not progress to the AD condition. Based on these data, the early identification of MCI patients with a high possibility of progression to AD, by means of one or more noninvasive and inexpensive early detection biomarkers, could be crucial to initiate rehabilitative or pharmacological interventions aimed at slowing the progression of cognitive deficits and the onset of disability. Instrumental investigations have been developed to diagnose AD in its preclinical or prodromal phase that produce biomarkers such as examination of A β 42 and tau proteins in CSF, hippocampal and cerebral cortex volumetry by MRI, and assessment of brain metabolism and A β 42 accumulation by PET. These are complex and expensive investigation techniques, in some cases, invasive, suggested by international guidelines when there is a well-founded suspicion of AD or cerebrovascular disorder, but it is unrealistic to think of applying them on a large scale in a population as large as that of the elderly at risk of cognitive decline. The EEG recorded at rest with eyes closed and eyes open (rsEEG) represents a non-invasive procedure, easily available and inexpensive, suitable to be applied on a large scale on elderly subjects with cognitive deficits (not implying too much cooperation from the subject or prolonged states of complete immobilization). Numerous studies of our research group on patients with dementia and MCI due to AD, Parkinson's disease (PDD) and Lewy body disease (DLB) have shown that our approach based on the study of EEG sources is useful to describe the abnormalities of oscillatory neurophysiological mechanisms underlying the regulation of vigilance in these neurodegenerative processes.

Hypothesis and Significance: 1. Quantitative EEG markers of cortical functional connectivity in relation to cognitive reserve, gender and age may enlighten neurophysiological mechanisms regulating vigilance in the prodromal and dementia stages of Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease. 2. Digital enabling techniques including artificial intelligence, telemonitoring, and telemedicine may have a significant clinical impact in the assessment and training of cognitive function in patients with Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease.

Specific Aims: 1. Improve the clinical information value of quantitative EEG markers of cortical functional connectivity in the course of Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease, including using advanced machine learning procedures. 2. Investigate the impact of cognitive reserve, gender and age on neurophysiological mechanisms regulating vigilance in the prodromal stages of Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease. 3. Further develop telemonitoring and telemedicine technologies in the assessment and training of cognitive function in patients with Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease.

Expected outcomes: 1. EEG markers will show significant differences in the topography and frequency of the abnormalities in the cortical functional synchronization and connectivity along the course of Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease. 2. Cognitive reserve, gender and age will show a significant role in the resilience of neurophysiological mechanisms regulating vigilance in the prodromal and dementia stages of Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease. 3. Telemonitoring and telemedicine technologies will be well tolerated and provide important information about the clinical fluctuations of patients with Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease that could not be measured in hospital visits.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Significance and Innovation: 1. Advanced EEG markers, telemonitoring, and telemedicine, and artificial intelligence tools of this project may be tested in clinical research to detect the patients with Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease having the same diagnosis but different impairment of the neurophysiological mechanisms regulating vigilance in the prodromal and dementia stages of the diseases. 2. Information regarding cognitive reserve, gender, and age will be used in clinical research to better take into account the residence model in the clinical prediction of the effects of pharmacological and non-pharmacological (virtual cognitive training) interventions in patients with Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease."

Translational relevance: 1. Advanced EEG markers, telemonitoring, and telemedicine, and artificial intelligence tools of this project may be tested in DAILY CLINICAL ROUTINE to detect the patients with Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease having the same diagnosis but different impairment of the neurophysiological mechanisms regulating vigilance in the prodromal and dementia stages of the diseases. 2. Information regarding cognitive reserve, gender, and age will be used in DAILY CLINICAL ROUTINE to better take into account the residence model in the clinical prediction of the effects of pharmacological and non-pharmacological (virtual cognitive training) interventions in patients with Alzheimer's, Parkinson's and Lewy Body disease."

11 : Studio del Metiloma in soggetti con malattia di Parkinson, altre malattie neurodegenerative e malattie non neurodegenerative.

Responsabile: Salluzzo Maria Grazia

Programma:

Parole chiave: Malattia di Parkinson; Parkinsonismi; Corea di Huntington; malattie neurodegenerative; metiloma

Altri enti coinvolti: Genomix4life Baronissi (SA)

Anno inizio: 2023

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Descrittiva

Project Classification IRG: Genes, Genomes and Genetics

Project Classification SS: Genetics of Health and Disease - GHD

Descrizione: In questo studio ci proponiamo di analizzare i siti metilati dell'intero genoma "Metiloma" in gruppi di soggetti con malattia neurodegenerativa. La metilazione del DNA nei vertebrati avviene tipicamente nei siti CpG (citosina-fosfato-guanina; dove la citosina è direttamente seguita da una guanina nella sequenza del DNA); tale metilazione risulta nella conversione della citosina in 5-metilcitosina. La formazione del Me-CpG è catalizzata dall'enzima DNA metiltransferasi. I siti CpG sono poco comuni nel genoma degli invertebrati mentre sono spesso trovati con maggior densità nei promoter genici dei vertebrati, Homo Sapiens compreso, in cui sono collettivamente denominati isole CpG. Lo stato di metilazione di questi siti CpG può avere un grave impatto sull'attività/espressione genica. Studi precedenti sui siti metilati in soggetti con malattia di Parkinson hanno individuato isole CpG in regioni del DNA che regolano i geni glucocerebrosidase 1 (GBA1), alfa-synuclein (SNCA) e Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)

Risultati e prodotti conseguiti: Progetto nuovo

Attività previste Ci proponiamo di studiare il metiloma dell'intero genoma in almeno 50 soggetti con malattia di Parkinson almeno 30 casi di Corea di Huntington. Nello studio è previsto un gruppo di soggetti di controllo da utilizzare per tutti i gruppi patologici studiati, al momento si ipotizzano circa 25 controlli. Da un punto di vista metodologico, dopo aver ottenuto il consenso informato, verrà estratto il DNA da un campione di sangue da ogni soggetto arruolato che verrà sottoposto a uno specifico protocollo che inizia con la "Reduced Representation Bisulfite Sequencing" (RRBS). Questa consiste in un trattamento del DNA con bisolfito al fine di poter smascherare le isole CpG; lo stesso DNA trattato tramite RRBS poi sarà sequenziato su piattaforma Illumina. Una parte dei risultati potrà essere confermata tramite pirosequenziamento. L'analisi dei geni differenzialmente metilati "Differentially methylated genes"(DMGs) sarà eseguita tramite "Pearson correlation analysis" dove verranno presi in considerazione i risultati del trascrittoma di un lavoro precedente come, ad esempio, quello di Salemi et al. del 2022

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Background: In this study we aim to analyze the methylated sites of the whole Methylome genome in groups of subjects with neurodegenerative disease. DNA methylation in vertebrates typically occurs at CpG sites (cytosine-phosphate-guanine; where cytosine is directly followed by a guanine in the DNA sequence); such methylation results in the conversion of cytosine to 5-methylcytosine. The formation of Me-CpG is catalysed by the enzyme DNA methyltransferase. CpG sites are uncommon in the invertebrate genome and are often found in higher density in vertebrate gene promoters, including Homo sapiens, where they are collectively referred to as CpG islands. The methylation status of these CpG sites can have a serious impact on gene activity/expression. Previous studies of methylated sites in people with Parkinson's disease have identified CpG islands in DNA regions that regulate glucocerebrosidase 1 (GBA1), alpha-synuclein (SNCA), and Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) genes

Hypothesis and Significance: For these reasons, we plan to study the whole genome methylome in subjects with Parkinson's disease, furthermore we plan to do the same study in other groups of subjects with other neurodegenerative diseases, such as Huntington's disease. We do not exclude studying the methylome in groups of non-neurodegenerative pathologies such as tumors in order to be able to compare the data of the various groups.

Specific Aims: The main aim of the study is to highlight de novo methylated sites of the genome in the groups of patients studied and to evaluate how these methylated sites affect the expression of the genes involved. Among the objectives there is also that of comparing the results of the various groups we studied by identifying, if present, mechanisms of comorbidity or inverse comorbidity.

Expected outcomes: We expect to better understand the relationships between methylation mechanisms and gene expression of the studied pathologies.

Significance and Innovation: Compare the methylome data obtained in our study with the literature data to focus on any innovative data.

Translational relevance: The data obtained will be analyzed to identify predictive mechanisms in the early diagnosis of pathologies studied in the neurodegenerative field.

12 : Neuroinfiammazione e neurogenesi endogena in un modello traslazionale di malattia di Alzheimer sperimentale

Responsabile: L'Episcopo Francesca

Programma:

Parole chiave: Alzheimer's disease; trail; neurogenesis

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2023

Durata: 24

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Molecular, Cellular, and Developmental Neuroscience

Project Classification SS: Cellular and Molecular Biology of Neurodegeneration - CMND

Descrizione: La neurogenesi è il processo di formazione di nuovi neuroni a partire da cellule staminali o progenitrici che svolge un ruolo centrale nel neurosviluppo. È luogo comune pensare che la formazione di nuovi neuroni si esaurisca con l'adolescenza, invece nuovi neuroni si sviluppano anche nel cervello adulto sano. Dopo aver analizzato, postmortem, il tessuto cerebrale di soggetti sani e soggetti con Alzheimer i ricercatori hanno osservato che la neurogenesi era molto ridotta in questi ultimi. Questi pazienti infatti avevano decine di migliaia di neuroni in meno rispetto ai soggetti sani e la perdita di cellule progrediva con la gravità della malattia.

La neurogenesi adulta in roditori, primati non-umani ed esseri umani, avviene quasi unicamente in due aree cerebrali ben

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

precise e circoscritte, definite durante lo sviluppo embrionale:

- la zona sub-ventricolare (SVZ), da cui le cellule migrano verso il bulbo olfattivo;
- la zona sub-granulare (SGZ), le cui cellule neogenerate si vanno a collocare nello strato granulare del giro dentato dell'ippocampo.

Questo processo, chiamato neurogenesi ippocampale dell'adulto (AHN), conferisce un meccanismo unico di plasticità. Esso è infatti dinamicamente modulato da molte condizioni fisiologiche, epigenetiche e ambientali. E' il risultato degli input sinaptici che riceve, i quali ne influenzano proliferazione, sopravvivenza, differenziamento e integrazione nei circuiti nervosi.

L'ippocampo è una delle aree più colpite nella malattia di Alzheimer (AD) ed è notoriamente coinvolto nei meccanismi di memoria, apprendimento e di conseguenza, anche di molte risposte comportamentali, tra cui la flessibilità nell'esecuzione di nuovi compiti e le reazioni emotive.

La scoperta della neurogenesi adulta ha forti implicazioni per quanto riguarda il trattamento della malattia di Alzheimer. Infatti, trovare un modo per promuoverla in questi pazienti potrebbe essere un valido strumento nel trattamento della malattia stessa. Lo scopo del presente studio è quello di analizzare la neurogenesi adulta su cervelli di topi transgenici che esprimono tre mutazioni associate alla malattia di Alzheimer e che sviluppano in maniera progressiva sia le placche amiloidi che i grovigli neurofibrillari.

Risultati e prodotti conseguiti: Progetto nuovo

Attività previste A topi maschi 3Tg (suddivisi in gruppi di età differente), è stata somministrata BrdU (bromodeossiridina), un marcatore delle cellule proliferanti, secondo due protocolli sperimentali differenti e cioè 200mg/Kg in 4 somministrazioni oppure in un'unica somministrazione. I primi sono stati sacrificati 2 ore dopo l'ultima iniezione, i secondi 21 d dopo la fine del trattamento. Gli animali sono stati perfusi e i cervelli prelevati e conservati a -80°C. In 2 gruppi, è stato somministrato anti-TRAIL, un anticorpo monoclonale neutralizzante in grado di attenuare la neurotossicità indotta dalla beta-amiloide. Gli stessi trattamenti sono stati fatti anche su topi wild-type. Dai cervelli, saranno preparati una serie di vetrini sui quali poi stainare gli anticorpi di nostro interesse quali DCX (proteina associata ai microtubuli che viene espressa da cellule precursori neuronali e da neuroni immaturi in strutture corticali dell'embrione e dell'adulto), PSA-NCAM (per valutare i diversi gradi di maturazione dei neuroni), ed altri. Da alcune slides saranno estratte le proteine e l'RNA per studiare rispettivamente l'espressione proteica e genica nelle diverse situazioni. Inoltre, verificheremo se TRAIL possa svolgere un ruolo fisiopatologico nell'AD e se la sua neutralizzazione possa migliorare il deterioramento cognitivo.

Una terapia immunofarmacologica che agisca sul sistema di TRAIL potrebbe essere un potenziale trattamento per le malattie neurodegenerative correlate alla A β .

Background: Neurodegenerative disorders (NDDs) are major health issues in Western countries and are typically associated with aging. Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) are the most common neurodegenerative disorders worldwide. AD is a progressive disorder that causes the irreversible loss of memory and cognitive function. The main pathological features of AD are neuritic plaques and intracellular neurofibrillary tangles caused by the accumulation of amyloid-beta (A β) peptide and hyperphosphorylated microtubule-associated tau protein, respectively.

Neurogenesis is the process of forming new neurons from stem or progenitor cells that plays a central role in neurodevelopment.

Adult hippocampal neurogenesis (AHN) is a process dynamically modulated by many physiological, epigenetic and environmental conditions. It is the result of the synaptic inputs it receives, which influence its proliferation, survival, differentiation and integration into nervous circuits.

The hippocampus is one of the most affected areas in Alzheimer's disease (AD) and is known to be involved in mechanisms of memory, learning and consequently, also many behavioral responses, including flexibility in performing new tasks and emotional reactions .

Hypothesis and Significance: The discovery of adult neurogenesis has strong implications for the treatment of Alzheimer's disease. In fact, finding a way to promote it in these patients could be a valuable tool in the treatment of the disease itself.

Specific Aims: The aim of the present study is to analyze adult neurogenesis in the brains of transgenic mice expressing three mutations associated with Alzheimer's disease and progressively developing both amyloid plaques and neurofibrillary tangles.

Expected outcomes: From these studies we expect to clarify which are the possible mechanisms able to reactivate adult neurogenesis in brains damaged by neurodegenerative disease

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

- Significance and Innovation:** If there are cells capable of proliferation in the adult brain, one can think of a pharmacological strategy to stimulate these cells to replace those lost due to the disease.
The therapeutic strategies aimed at reintegrating the alteration of the neurogenetic process in the hippocampus and beyond, could be the turning point for being able to design and test any future pharmacological treatments to prevent or slow down the evolution of Alzheimer's disease.
- Translational relevance:** Restoring normal AHN levels in patients with Alzheimer's disease emerges as a potential therapeutic approach to counteract the progression of this currently incurable disease.
Furthermore, an immunopharmacological therapy targeting the TRAIL system could also be a potential treatment for A β -related neurodegenerative diseases.

Linea di ricerca n. 2 : ASPETTI NEUROPSICHIATRICI DEI DISTURBI DEL NEUROSVILUPPO: DALLA PRATICA CLINICA ALLE BASI NEUROBIOLOGICHE

01 : Analisi mediante sequenziamento di nuova generazione (next-generation sequencing) in famiglie con disturbo dello Spettro Autistico (ASD)

Responsabile: Cali Francesco

Programma:

Parole chiave: Disturbo dello spettro autistico, next generation sequencing, esoma, pannelli di geni.

Altri enti coinvolti: U.O.P.I. Malattie rare del sistema nervoso in età pediatrica. AOU Policlinico, PO San Marco, Catania.
U.O.C. NPIA - AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE DI SIRACUSA
Unità di Neuropsichiatria Infantile, ISMEP - ARNAS Civico Palermo, Italia
Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" Palermo, Italia;

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Metodologica

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Genes, Genomes and Genetics

Project Classification SS: Molecular Genetics - MGA

Descrizione: Il primo approccio diagnostico molecolare (primi due anni del progetto) verrà condotto utilizzando un pannello "mirato" analizzando 76 geni noti come causa dello spettro autistico. Successivamente (terzo anno) verrà effettuato lo studio dell'intero esoma delle regioni codificanti di circa 20.000 geni mediante la Tecnologia Next Generation Sequencing NGS.
La finalità dello studio è quella di aumentare le possibilità diagnostiche, conoscere meglio la causa e i rischi di ricorrenza nelle famiglie di ASD, identificare nuove mutazioni geniche eziologiche e identificare nuovi potenziali geni dell'autismo. Ciò potrebbe fornire un contributo per una maggiore comprensione del disturbo e per aprire il campo a future terapie. Le varianti identificate in questo studio ed eventuali nuovi potenziali geni saranno proposte alla letteratura internazionale come nuove mutazioni/geni associati all'autismo.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti: Sono stati ad oggi studiati 34 Bambini affetti da ASD, diagnosticati secondo linee guida ADIR-ADOS. In ciascuno Paziente con Autismo è stata definita o esclusa ogni forma sindromica per le sindromi già associate ad Autismo. Sono stati arruolati allo studio pazienti autistici negativi per Array-CGH ed X-fragile. L'approccio diagnostico molecolare è stato effettuato mediante l'uso di un pannello "mirato" analizzando 76 geni noti come causa dello spettro autistico (ADNP, ANK2, ANKRD11, ARID1B, ASH1L, ASXL3, BCKDK, BCL11A, CACNA1D, CACNA2D3, CEP41, CHD2, CHD8, CIC, CNOT3, CNTN4, CNTNAP2, CTNND2, CUL3, CUX1, DDX3X, DEAF1, DIP2C, DSCAM, DYRK1A, FOXP1, GABRB3, GIGYF2, GRIA1, GRIN2B, GRIP1, KATNAL2, KDM5B, KDM6A, KMT2A, KMT2C, KMT5B, MACROD2, MAGEL2, MECP2, MED13, MED13L, MET, MYT1L, NAA15, NCKAP1, NCOR1, NLGN3, NRXN1, PHF3, POGZ, PTCHD1, PTEN, RELN, RIMS1,

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

SCN2A, SCN9A, SETD5, SHANK2, SHANK3, SLC6A1, SMARCC2, SPAST, SRCAP, SYNGAP1, TAOK2, TBL1XR1, TBR1, TRIO, TRIP12, UBN2, UPF3B, USP15, USP7, WAC, WDFY3). L'analisi NGS è stata eseguita mediante tecnologia Next generation Sequencing (NGS) attraverso l'utilizzo dei file BAM, BAI e FASTQ, nonché i file delle varianti rilevate (VCF e TSV) utilizzando il software IonReporter (Thermo Fisher Scientific). Le informazioni ottenute mediante CoverageAnalysis sono state utilizzate per misurare la profondità media e la percentuale di copertura di ciascun gene. Le varianti identificate sono state filtrate in base alla copertura ($\geq 10X$), al valore MAF (Minor Allele Frequency) di $\geq 0,01$. Tutte le varianti identificate sono state confrontate con i seguenti database di polimorfismi/mutazioni: ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>), ESP (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). La patogenicità delle varianti missenso è stata valutata utilizzando i seguenti software in silico: SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, VarSome (linee guida ACMG). Sulla base di questi criteri sono state identificate varianti nei seguenti geni (tra parentesi il numero di volte che un gene è stato descritto nei pazienti): KMT2C (12), ANKRD11 (5), ASXL3 (5), SHANK2 (5), ANK2 (4), ARID1B (4), CEP41 (4), GIGYF2 (4), PHF3 (4), SRCAP (4), UBN2 (4), WDFY3 (4), GRIP1 (3), MED13 (3), RELN (3), SCN2A (3), TAOK2 (3), ADNP (2), ADNP (2), ASH1L (2), BCL11A (2), CACNA1D (2), DIP2C (2), KDM6A (2), MET (2), NCOR1 (2), NRXN1 (2), POGZ (2), USP15 (2), CACNA2D3 (1), CHD2 (1), CNOT3 (1), CNTN4 (1), CTNND2 (1), GRIA1 (1), KDM5B (1), MACROD2 (1), MAGEL2 (1), MECP2 (1), MED13L (1), MYT1L (1), GRIN2B (1), NCKAP1 (1), RIMS1 (1), SCN9A (1), SETD5 (1), SMARCC2 (1), SYNGAP1 (1), TBR1 (1), WAC (1).

In particolare è stata identificata in un paziente la variante c.160G>A (p.Val54Ile) nel gene GRIP1 (Chr12). Questa variante missenso è già stata descritta in altri pazienti riportata e associata con Autism (Karaca (2015) Neuron 88: 499 PubMed: 26539891) e descritta in ClinVar come Variante Likely pathogenic. In un secondo paziente è stata identificata la variante missenso: c.2141T>A (p.Val714Glu) nel gene GRIN2B (NM_000834.4) (Chr12), in eterozigosi, de novo. Il gene GRIN2B [Fenotipo OMIM: Developmental and epileptic encephalopathy 27 (616139) (AD), Intellectual developmental disorder, autosomal dominant 6, with or without seizures (613970) (AD)]. La variante non è stata descritta in altri pazienti (HGMD, The Human Gene Mutation Database Professional), non è stata riportata in ClinVar, ed classificata secondo le linee guida ACMG come Likely Pathogenic. In un terzo paziente è stata identificata la variante frameshift Deletion c.2323_2324delCT (p.Leu775ValfsTer4) nel gene POGZ (NM_015100.4)(Chr1), in eterozigosi, de novo, descritta in altri pazienti riportata come associata con Neurodevelopmental disorder (Wang (2020) Nat Commun 11: PubMed: 33004838) Fenotipo OMIM: White-Sutton syndrome (616364) (AD). Classificazione della Variante (ACMG): Likely Pathogenic.

Attività previste Attività 2023:

Scopo del progetto di ricerca è quello di studiare le correlazioni tra gli aspetti clinici, genetici in pazienti con lo spettro autistico (analizzando il trio) estendendo soprattutto l'indagine ai casi familiari (più soggetti affetti). Nel triennio verranno studiati 100 Bambini affetti da ASD, diagnosticati secondo linee guida ADIR-ADOS.

Background: Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder occurring early in life, with varying degrees of severity. Autism affects about 1/100 children, with an incidence four times higher in boys. The risk of recurrence (up to 90%) in identical twins and the increased frequency in siblings of patients with the disease justifies a genetic basis of the disease, but in most patients (60-70%), no causative genetic variants have been identified so far.

Hypothesis and Significance: This study is aimed to increase diagnostic possibilities and learn more about causes and risks of recurrence of ASD in families, as well as to identify new etiological gene mutations and new potential autism genes.

Specific Aims: This research is specifically aimed to investigate the correlations between clinical and genetic aspects in patients falling into the autism spectrum disorder (by analyzing the trios), extending the survey to other family members (including affected ones).

Expected outcomes: Identification of causative genetic variants associated with autism spectrum disorder and possible identification of new potential genes.

Significance and Innovation: To contribute to a greater understanding of the genetics of autism spectrum disorder and open research towards future innovative therapies.

Translational relevance: The mutations as identified in this study and any new potential genes will be proposed to the international literature as new mutations/genes associated with autism.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

02 : Caratterizzazione dello spettro genetico nelle Paralisi Cerebrali Infantili tramite sequenziamento dell'esoma

Responsabile: Vitello Girolamo Aurelio

Programma:

Parole chiave: paralisi cerebrale infantile, disabilità intellettiva, whole exome sequencing

Altri enti coinvolti: U.O.C. di NPI Policlinico G. di Martino, Università degli Studi di Messina

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Genes, Genomes and Genetics

Project Classification SS: Molecular Genetics - MGA

Descrizione: La Paralisi Cerebrale Infantile (PCI) è la prima patologia causa di disabilità motoria in età evolutiva con un'incidenza di 1,5 neonati ogni 500 nati. La PCI è un gruppo eterogeneo di sindromi non progressive che determinano turbe del movimento o di postura dovute ad un danno irreversibile e non progressivo del sistema nervoso centrale e che riconosce cause differenti che possono manifestarsi dal periodo gestazionale fino ai 2 anni di vita. Studi recenti mediante whole exome sequencing (WES) su soggetti affetti da PCI hanno dimostrato che la presenza di un'anomalia genica sottostante si riscontra in una percentuale rilevante, dal 8% al 26%/30%, della popolazione con diagnosi clinica di PCI [1,2,3]; in questo sottogruppo circa il 62% delle mutazioni riguardava patologie note [2]; queste coinvolgevano lo spettro dell'epilessia (50%), delle SPG (20%), delle Leucodistrofie (20%), di altre patologie neurologiche (10%)[2]; i disordini sindromici riscontrati rappresentano il 25%, i difetti metabolici il 12% [2]. Il difetto genico veniva rilevato nel 14% dei soggetti con storia clinica chiara ed eventi di rischio (ictus neonatale, distress respiratorio neonatale, Ittero nucleare) in grado di determinare una PCI, ma con caratteristiche fenotipiche compatibili con una sindrome sottostante (ipoplasia della via ottica, dotto arterioso pervio, valvola aortica bicuspidale, ipospadia e criptorchidismo, dismorfismi facciali, fessura laringea, ritardo di crescita intrauterina, midollo ancorato, dilatazione dell'aorta ascendente e ano imperforato)[2]). I difetti genici riscontrati coinvolgevano patologie AD nel 43.2%, AR nel 35.1%, AD/AR nel 2.7%, X-linked recessive nel 10.8%, X-linked dominanti nel 5.4% e X-linked D/R nel 2.7% [2]. I geni maggiormente coinvolti (ricorrenti in più soggetti della medesima coorte) rilevati negli studi su singole coorti, differenti per etnia e per eterogeneità dei campioni, appaiono differenti in ciascuna coorte: SATB2, ZMYM2, COL4A1, GNAO1, ATL1, POL2RA, legati all'X SLC16A2, THOC2 [1]; TUBB4A, CNQ2, ATL1, CACNA1A, FOXG1, GRIN2B, SPAST, HPRT1, NFIX, SCN1A, TH, WDR26 [2]. Gli studi recenti hanno consentito di identificare nuovi geni candidati ad essere associati a quadri clinici di PCI: SLC5A6 (Infantile-Onset-Biotin-Responsive neurodegeneration, NERIB) [4]; NSRP1 (Severe neurodevelopmental disorder with spastic cerebral palsy and epilepsy) [5]. Questi dati dimostrano che una percentuale significativa di soggetti con diagnosi clinica e anamnestica di PCI sono affetti da altra patologia genetica mascherata e che ampliare la popolazione di studio, replicando la ricerca su questo ambito in altre coorti di soggetti con PCI, può consentire di identificare il maggior numero di difetti genici occulti mascherati dalla PCI o correlabili alle PCI (geni non conosciuti e/o mutazioni nuove), non rilevate nelle specifiche coorti degli studi, differenti per caratteristiche intrinseche nell'eterogeneità del campione di studio. La ricerca si prefigge di caratterizzare geneticamente le forme di PCI, diagnosticate clinicamente/anamnesticamente, che potrebbero essere determinate da una alterazione genetica nota (altra patologia) o sconosciuta (non ancora associata a PCI), in accordo con le evidenze scientifiche emerse negli ultimi anni grazie alla tecnica di sequenziamento dell'intero esoma (WES).
1) Chopra M et Al. Mendelian etiologies identified with whole exome sequencing in cerebral palsy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2022 Jan 24. doi: 10.1002/acn3.51506.
2) Mei H et Al. Genetic Spectrum Identified by Exome Sequencing in a Chinese Pediatric Cerebral Palsy Cohort. *Pediatr.* 2021 Nov 14:S0022-3476(21)01084-2. doi: 10.1016/j.jpeds.2021.11.019
3) May HJ ET Al. Genetic testing in individuals with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 2021 Dec;63(12):1448-1455. doi: 10.1111/dmcn.14948
4) Holling T et Al. Novel biallelic variants expand the SLC5A6-related phenotypic spectrum. *Eur J Hum Genet.* 2022 Jan 11:1-11. doi: 10.1038/s41431-021-01033-2

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

5) Calame DG et Al. Biallelic loss-of-function variants in the splicing regulator NSRP1 cause a severe neurodevelopmental disorder with spastic cerebral palsy and epilepsy, Genet Med. 2021 Dec;23(12):2455-2460. doi: 10.1038/s41436-021-01291-x.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Alla data di oggi si è provveduto alla selezione e reclutamento, ancora in corso, dei pazienti in accordo con i criteri anamnestici e clinici stabiliti dello studio. Si è proceduto con il prelievo dei campioni biologici e all'estrazione e conservazione del DNA e già è in corso l'esecuzione dell'Esoma (WHOLE) dei primi campioni. Il numero dei pazienti attualmente selezionati è di 83, (52 paz. IRCCS Oasi e 29 paz. Clinica NPI Policlinico di Messina).

Attività previste Attività 2023:

La attività previste proseguiranno con:

- la simultanea selezione e reclutamento dei pazienti in accordo con i criteri della ricerca in oggetto, raggiungendo il numero massimo nel periodo di tempo previsto dalla ricerca;
- l'esecuzione dell'Esoma (WHOLE) e l'analisi delle mutazioni/varianti dei pazienti reclutati;
- la correlazione del dato genetico con l'evidenza clinica del singolo paziente e del gruppo iniziale di appartenenza al momento del reclutamento.
- l'analisi dei dati genetici globali ottenuti e l'elaborazione dei primi risultati statistici intermedi

Background:

Recent whole exome sequencing (WES) studies on CP patients have demonstrated the presence of an occult gene abnormality in a relevant percentage, from 8% to 30%, of the population with a clinical diagnosis of PCI (1,2,3); in this subgroup about 60% of the mutations concerned known pathologies (1) with possible consequences of a late diagnosis, on the clinical evolution and therapeutic choices for these patients. The definition of the genotype of subjects affected by CP can allow a better characterization of the phenotypic spectrum of CP, to define a differential diagnostic algorithm in the presence of atypical clinical signs that guide towards genetic syndromes masked by CP, to identify new genes not yet associated with CP.

Hypothesis and Significance:

CP are a heterogeneous group of diseases that recognize different causes, including the presence of an occult gene defect. The advent of WES has made it possible to more precisely define the real prevalence rate of occult gene defects in people with CP, and the identification of new disease genes associated with CP.

Specific Aims:

To define the genotype spectrum of CP; to identify new mutations related to CP, to improve the diagnostic workup in subjects with CP.

Expected outcomes:

- To detect the presence of hidden genetic abnormalities (known or new) in individuals with CP.
- Recognition of new genes linked to CP.
- Definition of new genetic syndromes.
- To better define the genetic spectrum of the parietic syndromes in childhood. Identification of the phenotypic characteristics or clinical/instrumental markers that can classify the risk of being affected by a gene pathology masked by CP.

Significance and Innovation:

Genetic characterization of CP, identification of new genes.

Translational relevance:

Identification of disease genes and improvement of the diagnostic workup in CP.

03 : Le epilessie: studio degli aspetti neurobiologici, genetici, clinici, neurofisiologici e terapeutici.

Responsabile: ELIA MAURIZIO

Programma:

Parole chiave: epilessie; genetica; EEG; terapia antiepilettica.

Altri enti coinvolti: Centri universitari e di ricerca (IRCCS, CNR, ecc.) i cui ricercatori sono afferenti alla Lega Italiana contro l'Epilessia.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Developmental Brain Disorders - DBD

Descrizione: Questa linea di ricerca esaminerà diversi aspetti (genetici, clinici, neurofisiologici e terapeutici) correlati all'epilessia, in particolare considerando quelli osservati nei nostri pazienti. I nuovi studi saranno costruiti sui risultati precedenti, con l'individuazione di nuovi ambiti di analisi e ricerca, in stretto rapporto con la pratica clinica quotidiana. Si prevede anche di ampliare la produzione scientifica con la pubblicazione di articoli su riviste internazionali peer-reviewed. I risultati di questo progetto di ricerca saranno direttamente trasferibili al SSN. Infatti, contribuiranno alla classificazione di sindromi epilettiche già note e nuove, facilitando la diagnosi nella pratica clinica quotidiana. Il corretto trattamento dell'epilessia ridurrà l'onere in termini di morbidità, problematiche scolastiche e familiari, mortalità. Una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base dell'epilessia potrebbe contribuire a identificare bersagli per nuovi farmaci da testare in un prossimo futuro.

Risultati e prodotti conseguiti: Risultati 2022: Sono stati conseguiti dati originali su rilevanti aspetti diagnostici e terapeutici inerenti sindromi epilettiche specifiche quali la sindrome di Lennox-Gastaut, la sindrome di Angelman e l'epilessia assenze del bambino; su un pattern elettroencefalografico peculiare, il trascinarsi fotico alla stimolazione luminosa intermittente, nei bambini con disturbo dello spettro autistico di maggiore gravità; sulle caratteristiche dell'epilessia in patologie rare dell'età evolutiva quali la sindrome ATRX, la sindrome di Pitt-Hopkins (da mutazione del gene TCF4), l'aploinsufficienza NFIA. Tali risultati hanno condotto alla pubblicazione dei seguenti articoli:

1. Riva A, Coppola A, Bonaventura CD, Elia M, Ferlazzo E, Gobbi G, Marini C, Meletti S, Romeo A, Santoro K, Verrotti A, Capovilla G, Striano P; Italian LGS Delphi Group. An Italian consensus on the management of Lennox-Gastaut syndrome. *Seizure* 2022; 101:134-140.
2. Vetri L, Maniscalco L, Diana P, Guidotti M, Matranga D, Bonnet-Brihault F, Tripi G. A Preliminary Study on Photic Driving in the Electroencephalogram of Children with Autism across a Wide Cognitive and Behavioral Range. *J Clin Med* 2022;11: 3568.
3. Aiello S, Mancardi MM, Romano A, Santucci M, Scaduto MC, Vari MS, Striano P, Operto FF, Elia M, Vitiello G, Del Giudice E, Terrone G. Electroencephalographic findings in ATRX syndrome: A new case series and review of literature. *Eur J Paediatr Neurol* 2022; 40:69-72.
4. Matricardi S, Bonanni P, Iapadre G, Elia M, Cesaroni E, Danieli A, Negrin S, Zagaroli L, Operto FF, Carotenuto M, Pisani F, Turco EC, Orsini A, Bonuccelli A, Savasta S, Concolino D, Di Cara G, Striano P, Verrotti A. Epilepsy, electroclinical features, and long-term outcomes in Pitt-Hopkins syndrome due to pathogenic variants in the TCF4 gene. *Eur J Neurol* 2022; 29: 19-25.
5. Operto FF, Orsini A, Sica G, Scuoppo C, Padovano C, Vivencio V, de Simone V, Rinaldi R, Belfiore G, Mazza R, Aiello S, Vetri L, Donadio S, Labate A, Pastorino GMG. Perampanel and childhood absence epilepsy: A real life experience. *Front Neurol* 2022; 13:952900.
6. Bertini V, Cambi F, Orsini A, Bonuccelli A, Fiorini A, Santangelo A, Scacciati M, Elia M, Galesi O, Peroni D, Valetto A. Phenotypic Spectrum of NFIA Haploinsufficiency: Two Additional Cases and Review of the Literature. *Genes (Basel)* 2022;13: 2249.
7. Ascoli M, Elia M, Gasparini S, Bonanni P, Mastroianni G, Cianci V, Neri S, Pascarella A, Santangelo D, Aguglia U, Ferlazzo E. Therapeutic approach to neurological manifestations of Angelman syndrome. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2022;15:843-850.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Attività previste Attività 2023:

Con questo ampio progetto si prevede di continuare ad affrontare i diversi aspetti - genetici, clinici, neurofisiologici e terapeutici - inerenti le epilessie e che sono molto frequentemente riscontrati nei pazienti afferenti al nostro IRCCS. I nuovi studi, proseguiranno quelli precedenti, in un susseguirsi logico e coerente di analisi osservazionali e, talvolta, interventistiche. Il focus sarà ancora particolarmente indirizzato agli specifici aspetti sopra descritti, ma non escluderà l'individuazione di nuovi ambiti di analisi e ricerca, in connessione con le problematiche con le quali ci confrontiamo nella pratica clinica quotidiana. In linea con il recente passato, si prevede di ampliare la produzione scientifica con la pubblicazione di articoli su giornali internazionali peer-reviewed e con IF nei quartili alti delle rispettive categorie.

Background: Epilepsy is a common neurological condition affecting people throughout lifetime, as a result of excessive and abnormal neuronal activity in the brain cortex. The prevalence of epilepsy is in the range 3-10 per 1,000; the incidence is 40-70/100,000/year in developed countries and 80-140/100,000/year in developing countries. Epilepsy is more common in subjects with neurodevelopmental disorders, such as intellectual disability, autism spectrum disorder, attention deficit hyperactivity disorder, learning disorders. The etiology of epilepsy is variable: birth defects, brain injuries, stroke, brain tumors, genetic defects determine a small proportion of cases. Epilepsy can often be confirmed by means of electroencephalogram (EEG); neuroimaging is helpful in disclosing structural brain abnormalities. Genetic testing (i.e. karyotype, FISH, CGH-array, NGS, WES, WGS) plays also an important role in diagnostic work-up, contributing to increase the number of cases with chromosome abnormalities and gene mutations. Seizures are controlled by drugs in about 70% of cases. A number of old and new antiepileptic drugs, with different mechanisms of action, are available. When seizures are drug resistant, surgery, neurostimulation or ketogenic diet may be considered.

Hypothesis and Significance: Epilepsy is a common neurological condition, especially in developmental age, often in comorbidity with neurodevelopmental disorders or rare diseases. In this perspective, it is significant to study genetic, clinical, neurophysiological and imaging aspects of epilepsy, in order to identify new homogeneous phenotypes. This project represents a multidisciplinary model focused to provide new information on pathophysiological mechanisms, clinical and EEG features, and new drug targets in common and rare forms of epilepsy.

Specific Aims: The primary aim of this project is to carry out a multidisciplinary (genetic, clinical, EEG, MRI) study of epilepsy, very frequent in the subjects usually coming to our observation at the Oasi Research Institute, utilizing observational or intervention analyses.

Expected outcomes: In line with our long experience on this topic, and with the encouraging results previously obtained, we expect to contribute to the knowledge of pathophysiology of epilepsy, and to publish a relevant number of peer-reviewed papers on international journals of this research area.

Significance and Innovation: Taking into account the great impact that epilepsy has on daily life, and the high prevalence of epileptic seizures in the population of patients with neurodevelopmental disorders (i.e. autism spectrum disorder, intellectual disability, learning disorders), this project is very significant in a diagnostic, prognostic and therapeutic perspective. Furthermore, innovative genetic (i.e., CGH-array, SNP-array, next generation sequencing, whole exome sequencing) and EEG techniques (i.e. high resolution EEG) are currently available at our Research Institute, and they can help in the understanding of epileptogenesis.

Translational relevance: The results of this research project will be directly transferable to the NHS. In fact, they will contribute to classification of already known and new epilepsy syndromes, facilitating diagnosis in the daily clinical practice. The correct treatment of epilepsy will reduce burden in terms of morbidity, school and family problems, and mortality. A better comprehension of pathophysiological mechanisms underlying epilepsy would indicate targets for new drugs to be tested in the near future.

04 : I disturbi del sonno: studio degli aspetti neurobiologici, clinici e neurofisiologici in età evolutiva

Responsabile: FERRI RAFFAELE

Programma:

Parole chiave: sonno; sindrome delle gambe senza riposo; movimenti periodici degli arti nel sonno; narcolessia; disturbi del respiro nel sonno

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Altri enti coinvolti: Ricercatori di centri universitari e di ricerca nazionali ed internazionali con provata esperienza nello studio dei disturbi del sonno

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Developmental Brain Disorders - DBD

Descrizione: Verranno studiati i diversi tipi di disturbi del sonno sopra descritti, molto frequentemente presenti nei bambini che regolarmente giungono alla nostra osservazione. Ci concentreremo su specifiche categorie di disturbi del sonno già descritti, senza escludere tuttavia l'individuazione di nuovi ambiti di ricerca, sempre correlati con le condizioni neurologiche dell'età evolutiva che affrontiamo nella pratica clinica quotidiana. Si prevede di ampliare la produzione scientifica, in termini di articoli pubblicati in riviste internazionali peer-reviewed e con IF nei quartili alti delle rispettive categorie. L'obiettivo principale di questo progetto è dunque quello di analizzare una serie di diversi disturbi del sonno, molto frequenti nei bambini osservati presso l'Oasi Research Institute, utilizzando analisi osservazionali o di intervento.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

L'attività di ricerca di questo progetto ha prodotto i seguenti articoli scientifici:

DelRosso LM, Flores GV, Ferri R, Mogavero MP, Diamond A. Assessment of Executive and Cognitive Functions in Children with Restless Sleep Disorder: A Pilot Study. *Brain Sciences*

Bruni O, Malorgio E, Doria M, Finotti E, Spruyt K, Melegari MG, Villa MP, Ferri R. Changes in sleep patterns and disorders in children and adolescents with Attention Deficit Hyperactivity Disorders and Autism Spectrum Disorders during the COVID-19 lockdown. *Sleep Med* 2022, 91:166-174

Bruni O, DelRosso LM, Mogavero MP, Angriman M, Ferri R. Chronic insomnia of early childhood: phenotypes and pathophysiology. *Neurosci Biobehav Rev* 2022, 137:104653

DelRosso LM, et al., Ferri R, Mogavero MP, Picchiatti DL. Clinical efficacy and safety of intravenous ferric carboxymaltose treatment for restless legs symptoms and low serum ferritin in children with autism spectrum disorder. *Sleep Med*

DelRosso LM, Mogavero MP, Fickensher A, Bruni O, Schenck CH, Ferri R. Effects of Bupropion and SSRI Antidepressants on Leg Movement Activity and Chin Muscle Tone During Sleep in Adolescents. *J Clin Sleep Med* 2022

Amin A, Mogavero MP, Ferri R, DelRosso LM. Incidental electrocardiogram abnormalities in children undergoing polysomnography. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 2021 Vol. 17, No. 12

Melegari MG, Bruni O, Sacco R, Costa A, Russo C, Ferri R, Caravale B. Motor characteristics in children with developmental coordination disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder: intergroups comparison and predictors. *Minerva Pediatr*, in press.

DelRosso LM, Mindell J, Bruni O, Mogavero MP, Ferri R. Periodic leg movements during sleep and iron status in infants with prematurity, Down syndrome and Prader-Willi syndrome. *J Sleep Res* 2022

Prono F, Bernardi K, Ferri R, Bruni O. The Role of Vitamin D in Sleep Disorders of Children and Adolescents: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* Feb 1 2022, 23, 3, 1430.

DelRosso LM, et al., Ferri R. Trazodone affects periodic leg movements and chin muscle tone during sleep less than selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants in children. *Journal of clinical sleep medicine* 2022, vol. 18, issue 12, p. 2829-2836

Attività previste Attività 2023:

Recentemente, studi di base, clinici e neurofisiologici hanno dimostrato in modo incontrovertibile che uno delle più rilevanti funzioni del sonno è la protezione e la ricostituzione della plasticità del SNC, essenziale per il normale sviluppo cognitivo. I disturbi del sonno possono interferire costantemente con diverse e complesse funzioni cognitive in modo più o meno significativo, a seconda della gravità. Questo articolato progetto di ricerca ha lo scopo principale di studiare diversi tipi di disturbi del sonno, molto comuni nei soggetti in età evolutiva riferiti all'IRCCS, con l'uso di analisi osservazionali e talvolta interventistiche. L'interesse si è concentrato in particolare su alcune categorie di disturbi, ma è prevedibile l'individuazione di nuove aree di analisi e di ricerca, in correlazione con le patologie che si affrontano nella pratica clinica di routine. Un'area di ricerca di primaria importanza è quella dei disturbi del movimento nel sonno (sindrome delle gambe senza riposo o RLS e

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

movimenti degli arti nel sonno o PLMS, come focus principale ma non esclusivo). Il nostro gruppo, in particolare, ha contribuito a definire alcuni parametri regolatori per la definizione dei PLMS in età evolutiva. Inoltre, abbiamo svolto un ruolo fondamentale per definire gli aspetti clinici e strumentali di una nuova categoria di disordine del movimento in sonno, denominata Restless Sleep Disorder (RSD), per la quale sono previsti ulteriori studi per approfondirne meccanismi e possibile terapia. Tali condizioni, in conseguenza dell'alterazione strutturale del sonno notturno, determinano conseguenze generali sull'attenzione e sulle capacità cognitive dei soggetti affetti da disturbi del sonno. Un altro disturbo del sonno di particolare rilevanza per la ricerca è la narcolessia, una condizione rara caratterizzata, oltre ad altri sintomi specifici, da importante sonnolenza diurna e da improvvisi attacchi di sonno che compromettono notevolmente l'attività diurna dei pazienti in età evolutiva, con conseguenti disfunzioni in ambito scolastico, familiare e sociale. Questo progetto è anche dedicato allo studio dell'insonnia e dei disturbi del ritmo circadiano che anche essi comportano anche una riduzione dell'attenzione e della capacità di memoria in età evolutiva. L'elevata prevalenza dei disturbi respiratori del sonno (e in particolare delle apnee ostruttive del sonno o OSAS) ci induce a studiare tale condizione il cui trattamento è prevalentemente chirurgico, in questa fascia di età, oltre che pneumologico o ortodontico, per le sue profonde conseguenze sia sull'attenzione che sugli aspetti cognitivi, ma anche per l'elevata frequenza con cui favorisce la comparsa di una costellazione di altre patologie sistemiche.

- Background:** Several studies in children and adolescents have demonstrated that sleep interacts in a complex way with cognitive performance. Moreover, the role played by specific sleep features in learning and memory processes has been extensively documented in animals and adults, and has been increasingly studied in children. In children and adolescents with typical development or with neurodevelopmental disorders, sleep disorders can be common, including difficulties in initiating or maintaining sleep, abnormal circadian rhythms, obstructive apnoeas, sleep-related seizures or movement disorders (i.e. restless legs syndrome, periodic limb movements, restless sleep disorder). Frequently, there is an interaction between sleep behavior and psychopathology (i.e. autism spectrum disorder, attention deficit hyperactivity disorder), so that sleep problems may contribute to the intensity and maintenance of mental disorders in developmental age. Current research clearly indicates that the precise classification and the consequent adequate treatment of these sleep disorders can provide relevant cognitive and behavioral benefits.
- Hypothesis and Significance:** Sleep disorders appear to be correlated with cognitive and behavioral disturbances in developmental age, as risk factors, comorbidities, or effects of those conditions. Thus, we consider very significant to systematically study sleep characteristics in children with typical development and with neurodevelopmental disorders. This project will provide a neurophysiological model which could be able to clarify physiological and pathophysiological factors underlying sleep pattern in those subgroups of subjects.
- Specific Aims:** The primary aim of this project is to analyze a number of different sleep disorders, very frequent in the children usually coming to our observation at the Oasi Research Institute, utilizing observational or intervention analyses.
- Expected outcomes:** In line with our long experience on this topic, and with the encouraging results previously obtained, we expect to contribute to the knowledge of pathophysiology of sleep disorders in childhood, and to publish a relevant number of peer-reviewed paper on international journals of this research area.
- Significance and Innovation:** Considering the great impact that sleep has on cognition and behavior in children, and conversely the high prevalence of sleep disorders associated with neurodevelopmental disorders, it appears very clear the significance of this project both for the correct classification of the events, both for potential new therapeutic perspectives. Furthermore, innovative quantitative computer-aided analysis methodologies are currently available at our Research Institute, and they greatly help in the interpretation of sleep disruption and its pathophysiological consequences on brain function.
- Translational relevance:** The results of this research project will be easily transferable to the NHS. In fact, they will allow a more precise classification of sleep disorders and this will facilitate diagnosis in the daily clinical practice. The correct treatment of sleep disorders (i.e. sleep apnoeas) will lead to an improvement of cognitive and behavioral disturbances in developmental age, with a reduced burden in terms of morbidity, school and family problems. A better comprehension of pathophysiological mechanisms underlying sleep disorders would indicate targets for new drugs to be tested in the near future.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

05 : Studio degli effetti dell'acido valproico in un modello di neuroni in vitro : neuroprotezione e neuroplasticità.

Responsabile: Bonaccorso Carmela Maria Giovanna

Programma:

Parole chiave: cellule di neuroblastoma, sh-s5y5, recettore mGlu, acido valproico, stress ossidativo, granuli di stress, proteine di legame all'RNA

Altri enti coinvolti: IRIB-CNR, Dott.ssa Maria Vincenza Catania, Dott.ssa Michela Spatuzza.

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Prevenzione

Project Classification IRG: Molecular, Cellular, and Developmental Neuroscience

Project Classification SS: Neurodifferentiation, Plasticity, and Regeneration - NDPR

Descrizione: Studi condotti sulla patogenesi dei disturbi del neurosviluppo associati a disabilità intellettive e delle malattie neurodegenerative, hanno riportato che tra i diversi fattori potenzialmente implicati, un ruolo importante è svolto da squilibrio tra la trasmissione nervosa eccitatoria ed inibitoria, neuroinfiammazione, ridotta neurogenesi e stress ossidativo. Nel sistema nervoso centrale (SNC), il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio, ed una disfunzione dei recettori metabotropici e delle proteine sinaptiche ad essi associate svolge un ruolo chiave nei fenomeni di plasticità sinapica che appaiono alterati in molte patologie neurologiche, compresi i disordini del neurosviluppo e le malattie neurodegenerative. In generale, è noto che l'acido valproico (VPA), farmaco multifunzionale ed ampiamente usato come antiepilettico, è in grado di esercitare i suoi effetti sia sui meccanismi di neurotrasmissione mediata dal glutammato, sia sulla tossicità indotta da stress ossidativo. Con questo progetto, proponiamo di studiare, in cellule di neuroblastoma SH-SY5Y indifferenziate e differenziate, gli effetti modulatori indotti dall'esposizione al valproato sui livelli di espressione dei recettori metabotropici del glutammato e delle proteine ad essi associate, così come i possibili effetti neuroprotettivi del VPA nei confronti della danno indotto da agenti ossidanti quali il perossido di idrogeno (H₂O₂) o la sodio arsenite (As). Il danno ossidativo è in grado di indurre la formazione dei granuli di stress all'interno della cellula, i quali svolgono un ruolo protettivo reclutando gli mRNA e proteine pro-apoptotiche. I risultati ottenuti da questo studio potrebbero ampliare le conoscenze relative ai meccanismi di azione dell'acido valproico con possibili ricadute per gli effetti di quest'ultimo sui meccanismi di plasticità sinapica e di neuroprotezione.

References

Arimoto-Matsuzaki K, Saito H, Takekawa M. TIA1 oxidation inhibits stress granule assembly and sensitizes cells to stress-induced apoptosis. *Nat Commun.* (2016); Jan 7;7:10252.

Aulas, A., Fay, M.M., Lyons, S.M., Achorn, C.A., Kedersha, N., Anderson, P., and Ivanov, P. Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci. *J. Cell Sci.* (2017); 130, 927-937.

Berna Terzioğlu, Bebitoğlu, Elif Özüz, Acet Gökçe. Effect of valproic acid on oxidative stress parameters of glutamate-induced excitotoxicity in SH-SY5Y cells. *Exp Ther Med.* (2020); 20(2): 1321-1328.

Boncella, A. E., Shattuck, J. E., Cascarina, S. M., Paul, K. R., Baer, M. H., Fomicheva, A., et al. Composition-based prediction and rational manipulation of prion-like domain recruitment to stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2020); 117, 5826-5835.

Bosetti F, Bell JM, Manickam P. Microarray analysis of rat brain gene expression after chronic administration of sodium valproate. *Brain Research Bulletin.* (2005); 65:331-338.

Cao, X., Jin, X., and Liu, B. The involvement of stress granules in aging and aging-associated diseases. *Aging Cell.* (2020); 19:e13136. doi: 10.1111/ace1.13136

Chateauvieux S., Morceau F., Dicato M., and Diederich M., Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid, *Journal of Biomedicine & Biotechnology.* (2010).

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Di Marco B, Dell'Albani P, D'Antoni S, Spatuzza M, Bonaccorso CM, Musumeci SA, Drago F, Bardoni B, Catania MV. Fragile X mental retardation protein (FMRP) and metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu5) control stress granule formation in astrocytes. *Neurobiol Dis.*(2021);154:105338.

Emara M. M., K. Fujimura, D. Sciaranghella, V. Ivanova, P. Ivanov, and P. Anderson, Hydrogen peroxide induces stress granule formation independent of eIF2 γ phosphorylation, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (2012); vol. 423, no. 4, pp. 763-769.

Kedersha N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2alpha to the assembly of mammalian stress granules, *The Journal of Cell Biology.* (1999) vol. 147, no. 7, pp. 1431-1442.

Martin S. and J. Tazi, Visualization of G3BP stress granules dynamics in live primary cells, *Journal of Visualized Experiments.* (2014); no. 87, article e51197.

Monti B, Gatta V, Piretti F, Raffaelli SS, Virgili M, Contestabile A. Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein. *Neurotox. Res.* (2010); 17:130-141.

Monti B, Polazzi E, Contestabile A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection *CurrMolPharmacol.* (2009); 2(1):95-109.

Romoli M, Mazzocchetti P, D'Alonzo R, Siliquini S, Rinaldi VE, Verrotti A, Calabresi P, Costa C. Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *CurrNeuropharmacol.* (2019); 17(10):926-946.

Ruiz-Ramos R, Lopez-Carrillo L, Rios-Perez AD, De Vizcaya-Ruiz A, Cebrian ME. Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kappaB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Mutat Res.* (2009); 674(1-2):109-15.

gobio C, Ghiglieri V, Costa C, Bagetta V, Siliquini S, Barone I, Di Filippo M, Gardoni F, Gundelfinger ED, Di Luca M, Picconi B, Calabresi P. Hippocampal synaptic plasticity, memory, and epilepsy: effects of long-term valproic acid treatment. *Biol Psychiatry.* (2010); 67(6):567-74.

Soria-CastroRodolfo, Alejandro Schcolnik-Cabrera, Gloria Rodríguez-López, Marcia Campillo-Navarro, Nahum Puebla-Osorio, Sergio Estrada-Parra, Iris Estrada-García, Rommel Chacón-Salinas, Alma D. Chávez-Blanco. Exploring the Drug Repurposing Versatility of Valproic Acid as a Multifunctional Regulator of Innate and Adaptive Immune Cells *J Immunol Res.*(2019): 9678098

Wolozin Benjamin, Pavellvanov *Nat Rev Neurosci.* Stress granules and neurodegeneration *Nat Rev Neurosci.* (2019); 20(11): 649-666.

Yiç U, Seçkin E, Kurul SH, Kuralay F and Dirik E: Effects of epilepsy and valproic acid on oxidant status in children with idiopathic epilepsy. *Epilepsy Res.* (2009); 84: 232-237

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

In questo primo anno, colture cellulari di cellule di Neuroblastoma indifferenziate SH-SY5Y sono state mantenute ed amplificate. Raggiunto l'80-90% di confluenza, le cellule sono state poste in medium di crescita in assenza di siero e trattate con acido valproico (VPA) a diverse concentrazioni (0,5 mM, 1 mM, 2mM e 5mM) per 24 ore.

In questo modello sperimentale, ci siamo proposti di indagare i possibili effetti modulatori del trattamento con VPA sui livelli di espressione dei recettori metabotropici del I gruppo (mGlu1-5), II (mGlu2-3) and III (mGlu7) e delle proteine ad essi associate Homer1b/c, PSD-95, Preso1, CDK5, norbina,.

I risultati ottenuti mediante analisi con Western blotting, hanno permesso di evidenziare diversi andamenti nella variazione dell'espressione delle proteine indagate, a seguito del trattamento con VPA.

Il rilevamento delle bande e l'acquisizione delle immagini è stata eseguita mediante lo strumento Chemidoc Imaging System (Biorad). L'analisi densitometrica dell'intensità delle bande è stata eseguita con il software Image J.

L'espressione di ogni singola proteina è stata prima normalizzata alla corrispondente GAPDH, e poi al rispettivo controllo.

I risultati ottenuti dall'analisi statistica della quantificazione dell'analisi densitometrica delle singole proteine hanno evidenziato che le cellule di Neuroblastoma indifferenziate SH-SY5Y :

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

1) esprimono in basale i recettori metabotropici del I gruppo (mGlu1-5), II (mGlu3) and III (mGlu7)

In particolare:

2) L'esposizione ad VPA induce una progressiva riduzione del profilo di espressione del recettore mGlu5 e del recettore mGlu3 a dosi crescenti di VPA con una significativa riduzione dei livelli di espressione del recettore mGlu5 già a basse concentrazioni (VPA 0,5 mM).

3) Il recettore mGlu1 ζ mantiene un alto livello di espressione a (VPA 0,5 e 1mM), per poi ridursi notevolmente a concentrazioni maggiori (VPA 2 mM e 5 mM).

4) Il profilo di espressione del recettore mGlu7, mostra un andamento crescente dell'espressione del recettore alle diverse concentrazioni di VPA indagate, con significativo aumento dei livelli di espressione del recettore a concentrazioni elevate (VPA 5mM).

5) Lo studio del recettore mGlu2, dovrà essere maggiormente approfondito, poiché l'anticorpo inizialmente individuato riconosce sia il recettore mGlu2 che il recettore mGlu3, come dimostrato da controlli interni mediante utilizzo di lisati di topo Knockout per il recettore mGlu2, lisati di topo Knockout per il recettore mGlu3 e lisati di topo doppio Knockout mGlu2/3.

L'analisi degli andamenti delle proteine associate ai recettori metabotropici del gruppo I ha evidenziato che:

1) Le cellule di Neuroblastoma indifferenziate SH-SY5Y esprimono in basale le proteine associate ai recettori metabotropici del I gruppo, Homer1b/c, norbina, Preso1, CDK5 e la proteina post-sinaptica PSD-95.

2) Le proteine scaffolding Homer 1b/c e PSD-95 mostrano opposti profili di espressione VPA dose dipendenti. Infatti, è stato osservato per Homer 1b/c un significativo andamento crescente, contro una significativa riduzione dei livelli di espressione della PSD-95.

3) L'espressione della proteina CDK5 non mostra alcuna differenza significativa alle diverse concentrazioni di VPA rispetto alla condizione controllo (CTR).

4) Il profilo di espressione della proteina Preso1, mostra una lieve, ma non significativa, riduzione alle diverse concentrazioni di VPA indagate.

5) Significativa riduzione nei livelli di espressione della proteina Norbina sono stati osservati all'aumentare delle concentrazioni di VPA.

Attività previste Attività 2023:

- Confermare o individuare, in colture di cellule neuronali differenziate, le possibili differenze nei livelli di espressione delle proteine indagate.
- Individuare i segnali di trasduzione implicati nella modulazione dell'espressione dei recettori metabotropici - Studiare gli effetti del trattamento con VPA prima dell'esposizione a perossido di idrogeno (H₂O₂) o sodio arsenite (NaAsO₂), al fine di evidenziare il possibile effetto neuroprotettivo, nei confronti del danno dovuto allo stress ossidativo.

Background: Valproic acid (VPA, 2-propylpentanoic acid) is a branched-chain saturated fatty acid, commonly used as antiepileptic (Chateauvieux et al., 2010), whose mechanisms of action are not yet clear and whose pharmacological effect is occurs at different levels. VPA is a multifunctional drug, also used for the treatment of manic state in bipolar disorders, for the prevention of migraine, in the prophylaxis of immune disorders and as anti-neoplastic agent in various forms of cancer (Romoli et al 2019). The pharmacological effects of VPA involve different mechanisms of action, targeting neuroinflammation, oxidative stress and transcriptional regulation of gene expression at molecular level, and acting as inhibitor of histone deacetylases (HDACs) (Monti et al., 2009), promoting RNA interference, activating histone methyltransferases, or repressing the activation of transcription factors (Soria-Castro et al 2019).

The therapeutic effects of VPA involve modulation of the signaling pathways of multiple proteins inherent synaptic transmission, ion and transport channels, signals associated with G-proteins, protein kinases and phosphatases, regulation of transcription, of translation and apoptosis (Bosetti et al., 2005). In addition, VPA acts as a neuroprotective drug in both in vitro and in vivo models of neurodegenerative diseases (Monti et al., 2010).

It's known that metabotropic receptors and associated synaptic proteins play a central role in the neuronal plasticity underlying learning and their dysfunctions are implicated in intellectual disability and in the mechanisms of epileptogenesis. More importantly, mGlu receptors are considered possible target for therapeutic intervention in several neurological disorders, as pro-cognitive and neuroprotective drugs.

Administration of VPA has effects on glutamatergic transmission and synaptic plasticity (Sgobio et al., 2010), but there is no evidence regarding a possible effect of VPA on the expression and function of metabotropic glutamate receptors.

Another aspect is related to the neuroprotective effect of VPA against toxicity induced by oxidative stress, which is implicated in neuronal degeneration but also in synaptic dysfunctions that characterize intellectual disability, autism and epilepsy. Hydrogen Peroxide (H₂O₂) and sodium arsenite (As, NaAsO₂), are used to induce cellular damage from mimicking endogenous

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

oxidative stress (Ruiz-Ramos et al., 2009). It has been suggested that treatment with VPA could alter the balance between oxidant and antioxidant systems (Yiu et al., 2009).

When cells are exposed to different exogenous stresses, they respond with cytoplasmic accumulations of transient ribonucleoprotein complexes (RNP), called stress granules (SG), principally composed by RNA-binding proteins, translation initiation factors, and non-RNA-binding proteins (Cao et al., 2020). SGs are a dynamic and reversible protection mechanism (Aulas et al., 2017), since they disappear after the end of stress induction (Boncella et al., 2020). New finding highlighted that SGs has increasingly involved in neurodegenerative disorders (Wolozin et al., 2020). Our laboratory recently demonstrated that in Fmr1KO mice astrocytes, lacking the RNA-binding protein FMRP, a reduced number of SGs were observed in response to oxidative insults (Di Marco et al., 2021).

Furthermore, recent experimental data from neuroblastoma SH-SY5Y cell line, suggest that VPA may exert an anti-oxidant effect against glutamate-induced excitotoxicity (Bebitoğlu et al., 2020). We also reported that the activity of mGlu5 receptors can modulate SGs formation in murine culture astrocytes (Di Marco et al., 2021).

On the basis of the above described results we propose to study the effect of VPA on metabotropic glutamate receptor expression and coupled signaling. We will also try to establish a link between the VPA-induced modulation on glutamate transmission and formation of SGs, as defensive cell response under stress conditions.

Hypothesis and Significance: A growing body of evidence suggests the crucial role of both mGlu receptors and oxidative stress in neuronal plasticity and in the regulation of transient mRNA at synapses; as observed in neurodegenerative and neurodevelopmental disorders.

Literature data showed that VPA exhibits multiple mechanisms of action with different end goals. Indeed, treatment with VPA is able to modulate excitatory neurotransmission and also plays a role in the balance between oxidant and antioxidant molecules in cells.

However, the modulatory effects of VPA exposure on the expression levels of mGlu receptors and associated proteins have never been studied. Furthermore, there are no results on VPA modulation on SGs formation under stressful conditions.

RNA-binding proteins, in RNA granules play a variety of roles in regulating mRNA stability, localization, and translation in neurons, among these are recognized: TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein (TIA1), GTPase Activating Protein (SH3 Domain) Binding Protein 1 (G3BP), cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1 (CPEB), Fragile X Related Protein 1 (FXRP1), Fragile X mental Retardation Protein (FMRP).

When cells are stressed with As or H₂O₂, the primary RNA binding proteins as TIA1, and G3BP (Kedersha et al., 1999; Martin et al., 2014; Emara et al., 2012), are required to initiate the formation of stress granules.

A crucial step in formation of SGs is phosphorylation of eIF2 α , which inhibits canonical protein synthesis under stress conditions. Interestingly, oxidative stress cause oxidation of TIA-1 inhibiting the ability of TIA-1 to form stress granules and sensitizes cells to apoptosis (Arimoto-Matsuzaki et al., 2016).

In the present proposal, we hypothesize a VPA-dependent modulatory effect both on the expression levels of the metabotropic glutamate receptors and on mechanism underlying the formation of stress granules.

Since SGs exert a neuroprotective effect on cells under stress, we hypothesize that valproic acid may exert it neuroprotective action modulating mechanisms that underlie SGs formation, including RNA binding protein expression and eIF2 α phosphorylation.

The results obtained from these investigations could provide further insights into the mechanisms underlying valproic acid mechanisms of action, with important implication for neuroplasticity and neuroprotection

Specific Aims: The aim of this study is to clarify whether VPA has an effect on the expression of fundamental proteins in the mechanisms of homeostasis and synaptic plasticity, such as metabotropic receptors for glutamate (mGlu). Furthermore, we will study the effects of VPA treatment before exposure to H₂O₂ or sodium arsenite, in order to highlighted the possible neuroprotective effect, from damage due to oxidative stress, through the modulation of SGs formation. We will also examine the effect of VPA treatment on biochemical pathways associated with activation of metabotropic receptors and oxidative stress (MAPK, pAKT, mTOR). All experiments will performed in an in vitro model represented by undifferentiated and differentiated neuronal SH-SY5Y cells.

Expected outcomes: With our experiments, we expect to reveal: 1) VPA-mediated modulation in the expression of the mGlu receptors of groups I (mGlu1-5), II (mGlu2-3) and III (mGlu7); 2) A neuroprotective role of VPA from oxidative stress insult in undifferentiated neuroblastoma cells and neuronal differentiated SH-SY5Y in basal conditions; 3) A SGs dynamics formation after chemical exposure to As or H₂O₂, in presence or in absence of VPA treatment.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

- Significance and Innovation:** The proposed study may have implications for understanding the long-term effects of VPA treatment on excitatory neurotransmission and in particular on the effects mediated by metabotropic glutamate receptors. Furthermore, it could bring new knowledge on the role of VPA in the treatment of neurological disease characterized by oxidative stress damage.
- Translational relevance:** This study will expand knowledge on the possible mechanisms of action of a widely used drug, opening novel therapeutic opportunities for neurodegenerative and neurodevelopmental diseases.
-

06 : Approccio integrato ai disturbi del neurosviluppo

Responsabile: Buono Serafino

Programma:

Parole chiave: disturbi del neurosviluppo; diagnosi precoce; supporti tecnologici; trattamenti

Altri enti coinvolti: Dipartimento di Scienze del Farmaco (Prof. Filippo Caraci) dell'Università di Catania.

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Developmental Brain Disorders - DBD

Descrizione: Nel primo anno saranno identificati e reclutati i partecipanti e avviate le procedure diagnostiche, nel secondo saranno ultimate le procedure di raccolta dei dati, analizzati i principali trattamenti presenti nel contesto riabilitativo e avviati gli interventi identificati come maggiormente idonei, nel terzo saranno completati i trattamenti, analizzati i dati e divulgati i risultati. I partecipanti saranno persone di diversa età con diversi disturbi del neurosviluppo reclutati tra gli utenti afferenti presso i servizi dell'IRCCS Oasi Maria SS. di Troina. Saranno effettuate apposite sedute diagnostiche atte a rilevare abilità inerenti il funzionamento visuo-percettivo, le funzioni esecutive, la coordinazione motoria e altri indicatori neuropsicologici, comportamentali e adattivi, utili alla personalizzazione dei programmi d'intervento. Le attività abilitative saranno stimulate attraverso appositi training svolti in setting dedicati che prevedono la partecipazione di terapeuti ed operatori della riabilitazione. Strumenti tecnologici come l'eye tracking e il robot saranno utilizzati da personale specializzato e appositamente formato. Il robot viene utilizzato come mediatore iniziale e attivatore di processi di apprendimento di abilità sociali e adattive. In relazione alle procedure diagnostiche e all'inizio dei trattamenti nell'ASD e ID, attraverso colloqui, uso di strumenti diagnostici, analisi delle cartelle cliniche, interviste e questionari somministrati ai caregiver, da personale specializzato, si mira a rilevare dati inerenti l'età della diagnosi, le caratteristiche del funzionamento adattivo e degli interventi realizzati. In relazione agli interventi saranno presi in esame i principali modelli di trattamento psicosociale, riabilitativo, di mindfulness e farmacologico. I dati raccolti inerenti il profilo neuropsicologico e adattivo delle principali condizioni del neurosviluppo associate alla disabilità intellettiva, saranno utilizzati per un confronto tra le procedure diagnostiche e tra gli interventi riabilitativi posti in essere, sia in contesti residenziali sia territoriali e per orientare meglio le proposte di intervento differenziate per i diversi disturbi, con ricadute positive sulle qualità delle procedure cliniche.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

La prima fase del progetto ha riguardato la raccolta di dati inerenti l'epoca della diagnosi di autismo e la fase di avvio degli interventi dei bambini a cui viene posta la diagnosi di autismo afferenti presso i servizi dell'IRCCS Oasi Maria SS. di Troina. Tale aspetto risulta importante poiché negli ultimi anni si sta ponendo all'attenzione dei clinici sempre più il problema della diagnosi precoce dell'autismo e l'avvio tempestivo dei trattamenti. Diverse evidenze scientifiche sottolineano un importante ritardo sia nella formulazione diagnostica sia nella definizione ed avvio dei supporti necessari. In linea con gli obiettivi dello studio si stanno realizzando, nell'ambito delle attività cliniche previste durante i ricoveri, appositi colloqui anamnestici, osservazione, somministrazione di protocolli diagnostici specifici per l'autismo, analisi delle cartelle cliniche, rilevamento della diagnosi di autismo e somministrazione ai genitori/caregiver di una scheda appositamente elaborata. Il Questionario rivolto ai genitori/caregiver appositamente elaborato per lo studio è composto da una parte anagrafica e da

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

una serie di dati che l'intervistatore raccoglie tramite apposito colloquio.

Il questionario si compone da: nome e cognome dell'intervistato; la relazione (padre, madre ecc.) con la persona a cui è stata posta la diagnosi di autismo; età e titolo di studio ed occupazione del padre e della madre.

Relativamente alla persona con ASD vengono raccolti nome, cognome, genere, data di nascita, ordine di genitura, l'eventuale presenza di altri figli con diagnosi di ASD.

Vengono rilevati, inoltre, l'età in cui sono emersi i primi sospetti, chi li ha rilevati e quali sono stati i primi segni che hanno indotto a chiedere una valutazione.

Tramite l'applicazione del questionario viene rilevata l'età della prima visita, se è stata effettuata presso servizio pubblico o servizio privato, quanto tempo è trascorso dal sospetto alla prima visita effettuata, se il sospetto è stato confermato o sia stata posta altra diagnosi, in particolare Disabilità Intellettiva (con specificazione della gravità: lieve, moderata, grave, estrema) ed eventuali comorbidità quali per esempio Disturbo del Linguaggio, Disturbo dello Sviluppo della Coordinazione, ADHD, Epilessia o Sindromi Genetiche.

Un altro aspetto importante rilevato riguarda se l'avvio degli interventi è avvenuto prima o dopo aver ricevuto la diagnosi. Lo strumento rileva inoltre quali tipologie di intervento ri-abilitativo sono state effettuate, a che età, per quanto tempo e dove (servizio pubblico/privato convenzionato, servizio privato). Infine, vengono rilevati quali interventi effettua attualmente il bambino con ASD ad esempio Applied Behavior Analysis (ABA), Treatment and Education of Autistic and Communication Handicaped Children (TEACCH), Early Start Denver Model (ESDM), Psicomotricità, Logopedia dove e per quante volte a settimana.

Lo strumento viene somministrato da psicologi clinici appositamente formati.

In atto sono stati raccolti 65 protocolli. I principali dati preliminari sono i seguenti:

il campione è composto da 65 persone (56 maschi, 86% e 9 femmine, 14%) con diagnosi di ASD (criteri DSM-5 e ICD-10).

Il range di età è compreso fra i 2 e i 17 anni, 30 persone, il 46% del campione oltre alla diagnosi di ASD presentano in comorbidità altri disturbi del neurosviluppo.

Il range di età del campione varia da 1 anno e 5 mesi a 11 anni. La media dell'età della prima diagnosi è di 3 anni e 4 mesi.

In relazione alla media ed al range di età di inizio degli interventi prima della diagnosi si rileva un range che varia da 4 mesi a 4 anni e 6 mesi con media di 1 anno e 8 mesi. La media ed il range di età di inizio degli interventi dopo la diagnosi varia da da 0 mesi a 1 anno e 6 mesi con media di 2 mesi.

Attività previsteAttività 2023:

È previsto un ulteriore ampliamento del campione dei genitori di bambini con ASD afferenti presso i servizi dell'IRCCS Oasi Maria SS. di Troina a cui somministrare il questionario relativo alla raccolta di dati inerenti l'epoca della diagnosi di autismo e la fase di avvio degli interventi.

Background: The main clinical conditions of neurodevelopment - Intellectual Disability (ID), Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD), Specific Learning Disorder (SLD), Developmental Coordination Disorder (DCD), Autism Spectrum Disorder (ASD) - present functional deficits with important impact on the neuropsychological and adaptive area. In this context, it is important, for diagnostic purposes, to detect behavioral patterns and operating profiles, to be correlated with specific clinical treatments. It is also important, in some conditions such as ASD, to detect the age of onset of autistic symptoms and the time of the start of clinical interventions.

Hypothesis and Significance: In the context of neurodevelopmental disorders, it is necessary to identify specific patterns of functioning, by means of standardized diagnostic protocols as well as technological tools. Such cognitive and behavioral patterns can be used to better identify and patient-tailored treatments.

Specific Aims: The aim of the study is to detect specific profiles of neuropsychological and psychosocial functioning in the most common neurodevelopmental disorders associated with intellectual disability, through standard assessment procedures and technological aids, to be used as essential elements for the designing of patient-tailored treatments. Another aim is to determine the time of diagnosis and the proper time to start of interventions with particular reference to autism spectrum disorders.

Expected outcomes: Identification of integrated procedures in the treatment of neurodevelopmental disorders. Identification of the relationship between diagnosis date, intervention start and outcome.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Significance and Innovation: This project proposes an integrated and innovative approach from a technological point of view for both diagnostic and treatment procedure models. Specifically, the project is introducing three main innovations: the use of a robot to provide support during the diagnosis and rehabilitation of children with ASD and ID; implementation of new control strategies for the independence and safety of the child-robot interaction; use of the robot and eye tracking instruments during daily activities and standard therapeutic protocols.

Translational relevance: Project findings might positively impact on the emerging field of clinical application on integrated (psychosocial and technological) approach, namely cognitive robotic and eye tracking devices instead as an active part of intelligent care for patient-tailored interventions.

07 : Salute orale, qualità di vita e profilo comportamentale in bambini e adolescenti con disturbo dello spettro dell'autismo

Responsabile: Vetri Luigi

Programma:

Parole chiave: Disturbo dello spettro dell'autismo; Qualità igiene orale; comportamento; Qualità di vita

Altri enti coinvolti: Dipartimento di Scienze Psicologiche, Pedagogiche, dell'Esercizio Fisico e della Formazione dell'Università di Palermo.

Anno inizio: 2023

Durata: 12

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Descrittiva

Project Classification IRG: Biobehavioral and Behavioral Processes

Project Classification SS: Child Psychopathology and Developmental Disabilities - CPDD

Descrizione: Si stima che nel mondo circa un bambino su 100 sia affetto da disturbo dello spettro dell'autismo (ASD). L'ASD viene definito oggi come una sindrome comportamentale caratterizzata da problemi di tipo sociale, emozionale e nella capacità di comunicare affiancati a comportamenti ripetitivi, una difficoltà nel cambiare le loro attività quotidiane e anomalie sensoriali multimodali.

Le persone con disabilità intellettiva e patologie del neurosviluppo sono a maggior rischio di sviluppare un'insufficiente igiene orale a causa delle difficoltà a prendersi cura di sé, per la presenza di anomalie comportamentali e, talora, per la presenza di atipie sensoriali.

Il presente studio osservazionale si prefigge di valutare se la salute orale influenzi la qualità di vita di un campione di bambini e adolescenti con ASD, definito secondo i criteri del DSM5. Obiettivo secondario dello studio sarà evidenziare se la qualità dell'igiene orale si correla statisticamente a specifici pattern comportamentali o a specifiche caratteristiche socio-demografiche.

Il campione verrà arruolato selezionando i pazienti afferenti presso I.R.C.C.S. Associazione Oasi Maria SS e presso il dipartimento di Scienze Psicologiche, Pedagogiche, dell'Esercizio Fisico e della Formazione dell'Università di Palermo.

Risultati e prodotti conseguiti: Progetto nuovo

Attività previste Il presente studio prevede due fasi:

1. Valutazione dell'igiene orale: la valutazione dello status orale verrà effettuata sempre dallo stesso specialista in una sala odontoiatrica sensory adapted specificamente predisposta per pazienti con ASD. La determinazione della salute orale verrà effettuato tramite l'adattamento italiano della valutazione standardizzata: Oral health assessment tool. Dai risultati del test sarà possibile suddividere il campione in due gruppi: Gruppo con sufficiente igiene orale e Gruppo con insufficiente igiene orale.

2. Determinazione del profilo comportamentale e del benessere psicofisico del bambino con ASD tramite l'utilizzo di strumenti standardizzati: EQ-5D-Y (EuroQoL- five dimensions- Youth Proxy version), ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule- Second Edition), CASD (Checklist for Autism Spectrum Disorder); questionario sociodemografico.

L'analisi statistica verrà effettuata utilizzando il software SPSS e utilizzando un livello di significatività del 5%. La correlazione tra le variabili socioeconomiche, QoL e livelli di igiene orale verrà effettuato utilizzando il test Chi-quadrato. Per comparare i due gruppi indipendenti, derivati dai dati concernenti la qualità dell'igiene orale, verranno utilizzati appositi test parametrici o non parametrici in base alle caratteristiche di normalità e omoschedasticità della distribuzione.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

- Background:** It is estimated that worldwide about one in 100 children have autism spectrum disorder (ASD). Today ASD is defined as a behavioural syndrome characterized by social, emotional and communication problems together with repetitive behaviours, difficulties in changing daily routines and multimodal sensory abnormalities.
People with intellectual disabilities and neurodevelopmental disorders have an increased risk of developing poor oral hygiene because of difficulties in self-care, the presence of behavioural abnormalities and, sometimes, the presence of sensory dysregulations.
- Hypothesis and Significance:** The present study hypothesizes that children and adolescents with autism spectrum disorder presenting insufficient oral hygiene have negative repercussions in terms of quality of life and, therefore, they show higher frequency of behavioural abnormalities.
The present study expects to highlight lower quality of life levels and greater behavioural abnormalities in children and adolescents with autism spectrum disorder who present insufficient oral hygiene.
The results of the present study will allow the implementation of measures to contrast poor oral hygiene in children with autism, through improving caregivers' awareness of children with ASD and through the increase of periodic routine dental examinations.
- Specific Aims:** This observational study aims to evaluate whether oral health influences the quality of life of a sample of children and adolescents with ASD, defined according to DSM5 criteria. The secondary objective of the study is to highlight whether the quality of oral hygiene is statistically correlated to specific behavioural patterns or to specific socio-demographic characteristics.
- Expected outcomes:** The present study expects to highlight lower quality of life levels and greater behavioural abnormalities in children and adolescents with autism spectrum disorder who present insufficient oral hygiene.
- Significance and Innovation:** The results of the present study will allow the implementation of measures to contrast poor oral hygiene in children with autism, through improving caregivers' awareness of children with ASD and through the increase of periodic routine dental examinations.
- Translational relevance:** The results of the present study will allow the implementation of measures to contrast poor oral hygiene in children with autism, through improving caregivers' awareness of children with ASD and through the increase of periodic routine dental examinations.
-

Linea di ricerca n. 3 : NUOVE ACQUISIZIONI NEL GENOTIPO DEI DISTURBI DEL NEUROSVILUPPO

01 : Analisi clinica e molecolare dei disordini congeniti della glicosilazione: nuovi approcci molecolari per la diagnosi e la terapia

Responsabile: Barone Rita Maria Elisa

Programma:

Parole chiave: disordini congeniti della glicosilazione - disturbi del neurosviluppo - diagnosi - next generation sequencing - biomarcatori

Altri enti coinvolti: UO Esterne coinvolte

Unità cliniche di Neuropsichiatria Infantile, Genetica Medica e Clinica Pediatrica e del laboratorio malattie metaboliche del Centro di Riferimento per le malattie metaboliche congenite dell'AOU Policlinico G.Rodolico-San Marco' dell'Università di Catania.

Unità di spettrometria di massa dell'IPCB-CNR di Catania per analisi glicomica in casi selezionati attraverso tramite gli obiettivi del progetto

Anno inizio: 2022

Durata: 48

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Diagnostica

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Developmental Brain Disorders - DBD

Descrizione: Obiettivo 1: Si prevede la valutazione di circa 500 pazienti per anno che rispondono ai criteri di inclusione nello studio- a) disabilità Intellettiva sindromica e/o -Anomalie di sviluppo del cervelletto - e/o -Encefalopatie epilettiche precoci - e/o episodi stroke-like - con o senza una o più manifestazioni sistemiche (ritardo di crescita, ipoglicemia, epatopatia, endocrinopatia, miopatia etc.) b) disabilità dello sviluppo e/o patologia neuromuscolare con valutazione biochimica/molecolare non conclusiva per malattia mitocondriale.

I dati demografici anonimizzati e clinici dei pazienti studiati saranno stratificati in un archivio digitale con particolare riferimento alle caratteristiche dismorfologiche, microcefalia, anomalie malformative, livello cognitivo, neuroimmagini, presenza di epilessia, presenza di episodi stroke-like, dati di laboratorio (glucosio, funzione epatica, coagulazione, CPK etc).

I pazienti che rispondono alla presenza di un numero elevato di caratteristiche cliniche (cut-off > 2) verranno studiati per CDG con esame delle glicoforme della transferrina (CDT) nel siero. Tale analisi verrà eseguita tramite elettroforesi capillare presso il laboratorio malattie metaboliche dell'AOU Policlinico di Catania. I pazienti positivi allo screening per CDG (CDT+) saranno sottoposti ad analisi genetica tramite pannello NGS. In considerazione del fatto che esistono molte forme di CDG negative allo screening si prevede l'esecuzione del pannello anche in pazienti con transferrina negativa (CDT-) che presentano uno score clinico particolarmente elevato (cut-off ≥ 4) (Figura 1). Per i pazienti con NDD e/o sospette malattie mitocondriali che erano stati precedentemente sottoposti a un esoma clinico, si procederà con una rivalutazione dell'esoma con priorità per i geni CDG noti e CDG candidati.

Figura 1 Flow-chart clinica la diagnosi di CDG

A.

1. Syndromic DD/ID
 2. Congenital cerebellar atrophy
 3. Other CNS malformations
 4. Early epileptic encephalopathy
 5. Stroke-like episodes
 6. Peripheral Neuropathy (i.e. decreased OTR)
- (Score 1 for presence of each individual sign)

+/- B.

1. Liver involvement (i.e. increased serum AST, ALT, ALP)
 2. Coagulopathy (decreased FXI, AT-III)
 3. Endocrinopathy (i.e. hypoglycemia, increased serum TSH)
 4. Miopathy (i.e. increased serum CK)
 5. Skeletal involvement
 6. Skin changes (i.e. ichthyosis, inverted nipples, fat pads)
- (Score 1 for presence of each individual sign)

Screening test (CDT): A or A+B > 2

NGS: CDT +

NGS: CDT - (Cut-off = A > 2 + > 2)

Obiettivo 2, si prevede di valutare attraverso analisi di omozigotità oltre 200 geni implicati nella glicosilazione, includenti geni già associati a CDG e nuovi geni potenzialmente causativi per CDG. Sarà eseguita una analisi delle ROH utilizzando i dati molecolari ottenuti con SNP in pazienti con disturbi del neurosviluppo con o senza anamnesi familiare di consanguineità.

Le attività scientifiche sono finalizzate alla possibilità di caratterizzare dal punto di vista clinico e molecolare nuovi pazienti e di identificare nuovi fenotipi clinici e/o nuove varianti genetiche associati a queste malattie con importanti implicazioni scientifiche e di counselling genetico. Si prevede inoltre di identificare forme di CDG suscettibili di trattamento con importanti ricadute per quanto riguarda le manifestazioni cliniche e la prognosi dei pazienti affetti.

Risultati e prodotti conseguiti: Risultati 2022:

Scopo di questa ricerca è di implementare le conoscenze sulle caratteristiche cliniche, glicomiche e molecolari dei disturbi congeniti della glicosilazione. Nel primo anno di corso di questa RC sono stati analizzati oltre 700 campioni di siero di pazienti con disturbi del neurosviluppo tramite analisi delle glicoforme della transferrina sierica. È stato identificato un paziente con profilo CDG secondario alla presenza di una delezione in omozigosi del gene VPS13B (chr8q22.2 esoni 18-25) causativa per sindrome di Cohen. L'analisi dei glicani totali del siero con spettrometria di massa ha evidenziato nel

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

paziente una riduzione della sialilazione e galattosilazione. Il fenotipo clinico è definito dalla presenza di disabilità intellettiva di grado grave, microcefalia, degenerazione maculare, neutropenia, bassa statura (<< 3° pc).

La SC è un disturbo genetico del neurosviluppo causato dalla mutazione di VPS13B (chr 8q22.2) codificante per una proteina transmembrana coinvolta nel trasporto endolisomiale, nell'integrità dell'apparato di Golgi, nella glicosilazione delle proteine. VPS13B viene considerato un gene candidato per ASD sindromico, responsabile di tratti relativi al disturbo dello spettro dell'autismo come comportamenti stereotipati e interessi ristretti (1). Lo spettro clinico include: ritardo psicomotorio (100%), miopia (100%), dismorfismi cranio-facciali (100%), microcefalia (93%), distrofia retinica (83%), neutropenia (78%), bassa statura (65%), obesità truncata (53%), deficit di GH, ipotonia (2). I disturbi congeniti della glicosilazione (CDG) si associano a ipoglicosilazione del proIGF-1, ridotti livelli di IGF-1 del suo recettore, associati a ritardo di crescita, microcefalia, ipoplasia cerebellare, caratteristici anche della SC. In considerazione del difetto di galattosilazione delle proteine il paziente è stato sottoposto a supplementazione di galattosio nella dieta e questo ha comportato un progressivo miglioramento del profilo della glicosilazione misurata con analisi delle glicoforiche della transferrina sierica e tramite analisi glicomica con spettrometria di massa MALDI. Il paziente nel corso del trattamento con Galattosio è stato sottoposto a monitoraggio laboratoristico con prelievo ematochimico, esame delle urine ed ECG risultati nella norma. Nel corso della terapia i valori di IgF1 sierici sono progressivamente aumentati (Agosto 2022: 102,2 ng/ml; Settembre 2022: 133,1 ng/ml; Ottobre 2022: 146,3 ng/ml; Novembre 2022: 143,9 ng/ml; v.n. 49-520 ng/ml) così come i valori della conta assoluta dei neutrofilii (Agosto 2022: 1,29 x 103/μL; Settembre 2022: 1,65 x 103/μL; Ottobre 2022: 1,45 x 103/μL; Novembre 2022: 2,04 x 103/μL; v.n. 1.8-8 x 103/μL).

Prodotti della ricerca

- Randazzo M, Prato A, Messina M, et al. Neuroactive Amino Acid Profile in Autism Spectrum Disorder: Results from a Clinical Sample. *Children (Basel)*. 2023;10(2):412. Published 2023 Feb 20. doi:10.3390/children10020412
- Barone R, Cernigliaro L, Saccuzzo L, et al. PARK2 microdeletion in a multiplex family with autism spectrum disorder. *Int J Dev Neurosci*. 2023;83(1):121-131. doi:10.1002/jdn.10246
- Fabbri-Destro M, Maugeri F, Ianni C, et al. Early Sensory Profile in Autism Spectrum Disorders Predicts Emotional and Behavioral Issues. *J Pers Med*. 2022;12(10):1593. Published 2022 Sep 27. doi:10.3390/jpm12101593
- Di Patria L, Annibalini G, Morrone A, et al. Defective IGF-1 prohormone N-glycosylation and reduced IGF-1 receptor signaling activation in congenital disorders of glycosylation. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(3):150. Published 2022 Feb 24. doi:10.1007/s00018-022-04180-x"

Attività previste Attività 2023:

1. Aumentare il numero di pazienti da sottoporre allo screening per CDG
2. Aumentare il numero di pazienti con sindrome di Cohen diagnosticata da sottoporre a valutazione della glicosilazione e alla terapia con galattosio

Background:

Glycosylation is the most frequent post-translational protein modification. Glycans contribute to proper chemical and physical properties of glycoconjugates. Protein glycosylation is a vital process for appropriate central nervous system (CNS) and for maintaining CNS functions. Approximately 3-4% of the human genome, or about of the human 700 genes, participate in 28 glycosylation pathways [Schjoldager, 2020], resulting in over 150 different types of CDG identified to date. Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a group of genetic diseases caused by defects in the synthesis and attachment of the oligosaccharide moieties (glycans) of glycoproteins and glycolipids. Most CDG affect protein N- and O-glycosylation. Disorders of N-glycosylation can be subdivided into CDG-I (defects in the assembly of N-glycan₂s oligosaccharide precursor in the cytosol and the ER) and CDG-II (abnormal N-glycan processing mostly at the level of the Golgi apparatus). Serum transferrin glycoform analysis is the first-line laboratory test for the diagnosis of N-glycosylation defects. respectively. The analysis of mucin type O-glycosylated apolipoprotein CIII (apoCIII) is informative for the diagnosis of protein O-glycosylation as well as combined N- and O-glycosylation disorders. Since glycoproteins are ubiquitous molecules, most CDG are multisystem disorders with prominent neurological involvement. Developmental delay, hypotonia and failure to thrive, cerebellar atrophy, eye, hematologic, liver, and immune abnormalities may be present (Peanne et al., 2018). More than 150 CDG have been described so far. PMM2-CDG is the most frequently diagnosed CDG with a prevalence as high as one in 20,000 while the combined prevalence of 27 different N-glycosylation disorders was estimated around one in 22,000 Europeans but varied considerably across populations (Pajusalu et al., 2021). CDG subtype identification is challenging due to the large clinical and genetic heterogeneity. The great majority of CDG (82%) shows neuromuscular involvement (brain, peripheral nervous system, neuromuscular junction, muscular system, and/or retina) [Freeze et al., 2015]. The cerebellum is a target organ of CDG and is regularly affected in PMM2-CDG [Barone et al., 2014].

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Most CDG patients present with neurodevelopmental disorders (NDDs) such as developmental delay, intellectual disability and autism spectrum disorder. Moreover, early onset epileptic encephalopathy, stroke-like episodes, visual defects and peripheral neuropathy may be observed. Extra-neurological features are common but not mandatory for the diagnosis. In particular, liver dysfunction (from isolated hypertransaminasemia to liver cirrhosis), skeletal anomalies, endocrinological problems, coagulation defects, immune-deficiency and skin alterations are frequently observed. CDG diagnosis is challenging because of an extremely broad spectrum of clinical presentations that contributes to the underdiagnosis of these disorders. Research into the pathophysiological mechanisms of different CDG has resulted in the discovery of novel therapeutic approaches in the last years. Most of the therapies are based on the supplementation of dietary sugars or on the use of drug repurposing therapy (Verheijen et al., 2020).

Hypothesis and Significance: The first aim of the present proposal is to offer biochemical screening test and combined glycome analyses and targeted NGS methods to improve CDG detection and diagnosis contributing to better treatment also reducing the socioeconomic burden of these chronic disabling diseases. Owing to extreme clinical heterogeneity we foresee that a number of patients with CDG admitted for evaluation of NDDs is underdiagnosed. We aim to establish a clinical protocol to perform CDG biochemical screening and NGS analyses to selected patients based on clinical criteria.

The second aim of the proposal is particularly envisaged owing to the possible existence of a great number of novel CDG which may cause autosomal recessive neurodevelopmental diseases (ARNDDs) owing to deleterious mutations in candidate genes encoding glycosyltransferases (GTs). The discovery of genes involved in ARNDDs (Musante and Ropers, 2014) is considerably slower than in AD-NDDs. AR-NDDs are thought to be rare in western countries because of a low rate of parental consanguinity. Moreover, given the small sizes of families in those populations, AR-NDDs often present as isolated cases that do not allow a segregation analysis of possible recessive candidate variants. Although AD-NDD probably is the predominant form in western countries, recent estimates suggest that AR-NDDs may account for a non negligible part of sporadic cases that cannot be discriminated from AD-NDDs. Indeed, when considering an average of two children per family and a 5% of familial cases within ID patients referred to genetic services in central Europe, it has been calculated that recessive forms of ID may account for 20% of cases in those countries. Although every month recessive genes are reported in the literature, several considerations suggest that thousands of recessive genes have yet to be identified. Interestingly, recent studies have demonstrated an increased rate of runs of homozygosity (ROH) in autism, schizophrenia and ID in outbred populations (Hildebrandt et al., 2009; Gandin et al., 2015; Giacomuzzi et al., 2017;).

In the light of these considerations, we hypothesize that ROHs analysis may represent a genetic handle to identify recessive risk factors for CDG patients from outbred populations. Although in those populations most patients with recessive CDGs will be isolated cases, often indistinguishable from other dominant or recessive forms of NDDs, and that compound heterozygous mutations will be quite common in such patients, we think that a specific research for new recessive genes in CDGs should take advantage from ROH information for different reasons: 1) As part of the ROHs represent chromosomal segments identical by descent (IBD), a rare deleterious variant in an IBD segment may be in a homozygous form with a probability equal to its frequency, far greater than the square of its frequency expected for non-IBD segregating mutations. This consideration both implies that SNPs analysis in NDD patients may allow to identify a subset of them having CDG candidate genes located into ROHs and that NGS analysis in these patients should mainly focus in homozygous candidate variants occurring in the ROH regions given the posterior higher probability for a recessive, ultra rare, deleterious variant to map in these regions (5). 2) ROH data is often available since most of NDD patients underwent copy number analysis through SNP-array in the routine diagnostic setting.

Given these considerations, we plan to investigate recessive alleles in CDGs focusing on patients carrying long ROHs, either containing already known or candidate genes for CDG.

Specific Aims: Specific Aims (COMPILARE IL CAMPO IN LINGUA INGLESE)4000

1. We aim to establish a clinical protocol to perform CDG biochemical screening and NGS analyses to selected patients based on clinical criteria. This will increase CDG diagnosis among patients with NDDs attending the clinical facilities at IRCCS Oasi Troina (EN) and at Policlinico University of Catania. Patients will be enrolled in the study according to inclusion criteria following a clinical protocol. Inclusion criteria are as follows

a) Presence of syndromic global developmental delay/intellectual disability ζ and/or- cerebellum atrophy ζ and/or early epileptic encephalopathy ζ and/or stroke-like episodes with or without one or multiples systemic organ involvement (i.e. growth failure, liver disease, endocrinopathy, myopathy).

b) Presence of clinical signs suggesting mitochondrial diseases.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

c) Absence of diagnosis of mitochondrial disease.

Exclusion Criteria:

a) NDDs with underlying proven genetic diagnosis

We will apply and ad hoc clinical flowchart in house developed for selection of patients to be studied. The clinical flowchart takes into account the occurrence of neurological (Box A) and/or systemic signs (Box B) in CDG. We foresee that the higher is the score in A+B, the higher is the probability that the patient has a CDG (Figure 1).

Figure 1 Clinical flow-chart for CDG diagnosis

A.

1. Syndromic DD/ID
 2. Congenital cerebellar atrophy
 3. Other CNS malformations
 4. Early epileptic encephalopathy
 5. Stroke-like episodes
 6. Peripheral Neuropathy (i.e. decreased OTR)
- (Score 1 for presence of each individual sign)

+/- B.

1. Liver involvement (i.e. increased serum AST, ALT, ALP)
 2. Coagulopathy (decreased FXI, AT-III)
 3. Endocrinopathy (i.e. hypoglycemia, increased serum TSH)
 4. Miopathy (i.e. increased serum CK)
 5. Skeletal involvement
 6. Skin changes (i.e. ichthyosis, inverted nipples, fat pads)
- (Score 1 for presence of each individual sign)

Screening test (CDT): A or A+B > 2

NGS: CDT +

NGS: CDT - (Cut-off = A > 2 + > 2)

After obtaining the informed consent from the patients and/or their parents, patients will be selected according to clinical criteria for the following diagnostic procedures. In the case of a clinical cut-off ≥ 2 the CDT will be performed. In patients with positive CDT test indicating the presence of a disease in the N-glycosylation pattern, the NGS analyses is purchased to have a genetically proven CDG definitive diagnosis. As CDT screening test may be negative in various CDG, the NGS analyses will be performed in patients with clinical cut-off $> 4(A > 2 + B > 2)$.

2. The second aim of the proposal is particularly envisaged based on the possible existence of a great number of novel CDG which may cause autosomal recessive neurodevelopmental diseases (ARNDDs) owing to deleterious mutations in candidate genes encoding glycosyltransferases (GTs). We aim to investigate recessive alleles in CDGs focusing on patients carrying long ROHs, either containing already known or candidate genes for CDG. We hypothesize that ROHs analysis may represent a genetic handle to identify recessive risk factors for CDG patients from outbred populations.

Expected outcomes: The evaluation of about 500 patients per year who meet the following inclusion criteria in the study is expected - a) Syndromic intellectual disability and / or - Developmental anomalies of the cerebellum - and / or - Early epileptic encephalopathies - and / or stroke-like episodes - with or without one or more systemic manifestations (growth retardation, hypoglycemia, liver disease, endocrinopathy, myopathy, etc.) b) developmental disability and / or neuromuscular pathology with an inconclusive biochemical / molecular evaluation for mitochondrial disease. The anonymized and clinical demographic data of the patients studied will be stratified in a digital archive with particular regard to dysmorphological characteristics, microcephaly, malformative anomalies, cognitive level, neuroimaging, presence of epilepsy, presence of stroke-like episodes, laboratory data (glucose, liver function, coagulation, CPK etc). Patients who respond to the presence of a high number of clinical features (cut-off > 2) will be studied for CDG with serum transferrin glycoform (CDT) test. This analysis will be performed by capillary electrophoresis at the metabolic diseases laboratory of the AOU Policlinico di Catania. Patients who are positive for CDG screening (CDT +) will undergo genetic analysis via the NGS panel. In consideration of the fact that there are many forms of negative CDG at screening, the panel is also expected to be performed in patients with negative transferrin (CDT-) who have a particularly high clinical score (cut-off ≥ 4) (Figure 1). For patients with NDD and / or suspected mitochondrial diseases who had

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

previously undergone a clinical exome, we will examine the exome with priority for known CDG and candidate CDG genes.

As to the second aim of this proposal, we expect that ROH analysis will inform us on the occurrence of homozygous variants in CDG genes located in genomic regions identical by ancestry (IBD). We expect that the analysis of SNPs in patients with NDDs may allow to identify a subset of them that has candidate CDG genes located in the ROHs and that the NGS analysis in these patients should focus primarily on the homozygous candidate variants occurring in the ROH regions given the higher posterior probability of a recessive, ultra rare and deleterious variant to be mapped in these regions.

Significance and Innovation: Improved CDG diagnosis by offering standardized clinical criteria for considering CDG. The project will integrate expertises in clinical, glycomics and genetic diagnosis of CDG. Improved CDG diagnostics is expected to foster the development of therapies for CDG patients. Importantly a novel tool based on the analyses of ROH for genetic variants in GTs genes will be explored. This will lead to the utmost important information on the frequency of homozygous variants in GTs causing CDG or in candidate CDG genes in a population with NDDs.

Translational relevance: CDG symptoms are associated and/or resemble other diseases, therefore the diagnosis of CDG is very demanding. After suspicion of a CDG, the first step is the analysis of the Tf glycosylation status by IEF (CDT test). However, a significant number of CDG can not be detected by this assay. We will combine clinical, glycosylation and NGS analyses in an accessible diagnostic workflow to allow CDG diagnosis. This is particularly important for the genetic counselling and in view of possible therapy.

02 : Studio della trascrittoma e del genoma nei disturbi del neurosviluppo e nelle malattie rare

Responsabile: Salemi Michele

Programma:

Parole chiave: gene expression; neurodevelopmental disorders; rare diseases

Altri enti coinvolti: U.O.S. di Genetica Medica, ASP 7 di Ragusa; Dr.ssa Luana Mandarà
Genomix4life, Baronissi (SA)

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Descrittiva

Project Classification IRG: Genes, Genomes and Genetics

Project Classification SS: Molecular Genetics - MGA

Descrizione: Si prevede di reclutare una casistica statisticamente significativa dei gruppi che si vogliono studiare sia con valutazione del trascrittoma che del genoma. Quindi si procederà all'estrazione dell'RNA totale e del DNA e successivamente alle analisi molecolari previste. Il passaggio successivo riguarderà l'analisi bioinformatica e l'estrapolazione dei risultati che saranno pubblicati su riviste impattate internazionali.

Risultati e prodotti conseguiti: Risultati 2022:

Durante l'anno 2022 sono stati effettuati degli studi di sequenziamento tramite NGS in DNA di leucociti di soggetti con la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), lo studio riguarda soggetti a cui era stata eseguita una diagnosi genetica per la sindrome stessa (c.C305T:p.P102L per il gene PRNP). Lo scopo di questo studio è stato quello di sequenziare in pazienti con GSS, mediante Next Generation Sequencing (NGS), geni correlati a malattie che manifestano aspetti fenotipici simili alla GSS.

I risultati ottenuti sono stati utilizzati per scrivere un lavoro, da poco sottomesso a Human Cell, dal titolo "NGS study in a case series with a genetic diagnosis for Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (PRNP, p.P102L)". Nello stesso periodo è stata raccolta una casistica di sangue periferico di soggetti con autismo, al fine di poter eseguire uno studio del trascrittoma.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Attività previste Attività 2023:

Per il 2023/24 ci proponiamo di fare lo studio del trascrittoma su soggetti autistici. Tali risultati saranno oggetto di analisi ed utilizzati per una pubblicazione su rivista internazionale impattata. I risultati di tale studio potranno essere confrontati con dati ottenuti dallo studio del trascrittoma di altre casistiche che riguardano disturbi dello sviluppo neurologico.

Background: Neurodevelopmental disorders and rare diseases occupy a large proportion of genetically based diseases. The study of the transcriptome (mRNA, lncRNA and micro RNA) certainly plays a major role in identifying genes and gene regulatory mechanisms that assume important roles in these multifactorial diseases.

Hypothesis and Significance: We hypothesize that we will be able to identify very precise gene expression profiles in the various diseases under study. This will allow us to have other means in the diagnosis the various pathologies studied.

Specific Aims: The main purpose of the proposed study is to further elucidate the mechanisms of gene expression that regulate the neurodevelopmental disorders and rare diseases we will study. In addition, we will attempt to correlate genome mutations to RNA expression.

Expected outcomes: We expect to have new target genes differentially expressed or with yet unknown mutations related to the various diseases under study.

Significance and Innovation: We expect to have new target genes differentially expressed or with yet unknown mutations related to the various diseases under study.

Translational relevance: The data obtained and subsequently published may have a direct impact on the early detection of the various diseases under study. In addition, the identification of new genetic targets may contribute to the therapeutic aspect of the same diseases of the study.

03 : Genetica dei Disordini del Neurosviluppo e delle Malattie Rare

Responsabile: Romano Corrado

Programma:

Parole chiave: Neurodevelopmental Disorders; Intellectual Disability; Autism Spectrum Disorder; Epilepsy; Genodermatosis; Rare Diseases; Genetics; CNV; SNP; NGS; WES; WGS

Altri enti coinvolti: Human Technopole; IRCCS Auxologico; Radboud University, Nijmegen, Olanda; Pennsylvania State university, USA.

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Genes, Genomes and Genetics

Project Classification SS: Genetics of Health and Disease - GHD

Descrizione: La metodologia adottata dal progetto sarà caratterizzata dall'inclusione di pazienti con disturbi del neurosviluppo diagnosticati secondo i criteri del DSM-5 o con altre malattie rare. Questo campione di pazienti sarà sottoposto ad un approccio combinato includente WES, WGS, RNA-Seq associato alla ricerca di firme epigenomiche (epigenomic signatures), nell'ambito di un network nazionale ed internazionale. La possibile evidenza di nuove sindromi genetiche includenti disturbi del neurosviluppo o malattie rare potrà migliorare il follow-up dei pazienti che ne saranno affetti, gettando inoltre le basi per futuri approcci di genome editing. Il SSN potrà beneficiare di questi risultati con un miglioramento delle condizioni di salute dei pazienti coinvolti e della capacità dei professionisti sanitari di curarli meglio.

Risultati 2022:

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Risultati e prodotti conseguiti: Questo progetto ha focalizzato la sua attività nel corso del 2022 sullo studio di nuovi pazienti con Disturbi del Neurosviluppo alla ricerca di nuovi genotipi e della correlazione con i fenotipi sottostanti. Uno di questi è stato un paziente affetto da Dislessia e Disturbo da Deficit di Attenzione e Iperattività (ADHD). Abbiamo proceduto a riscontrare la presenza di una microdelezione di 452,4 Kb nella regione cromosomica 1p34.3. Utilizzando strumenti di valutazione psicopedagogica avanzata, abbiamo svolto un'azione di fenotipizzazione approfondita (deep phenotyping). La comparazione tra il fenotipo e il genotipo riscontrato nel paziente ci ha permesso, anche mediante una revisione della letteratura riguardante pazienti con associazioni genotipo-fenotipo sovrapponibili, di elucidare il possibile ruolo di geni coinvolti nella delezione nel determinare il fenotipo associato. Nell'ambito di un'attività di collaborazione con gruppi di ricerca di altri IRCCS, si è partecipato ad uno studio collaborativo allo scopo di delineare la correlazione genotipo-fenotipo delle delle delezioni interstiziali 12q21.

Attività previste

Attività 2023:

Altre attività che non hanno ancora prodotto pubblicazioni scientifiche sono state quelle di collaborazione con il Prof. Santhosh Girirajan della Pennsylvania State University (lavoro sottomesso ad American Journal of Psychiatry) e con il Prof. Giuseppe Testa dello Human Technopole di Milano (12 famiglie inviate per lo studio di modellizzazione high-throughput).

Attività 2022:

Il DSM-5 definisce i Disturbi dello Sviluppo Neurologico come condizioni cliniche che si sono manifestate tipicamente durante le prime fasi - spesso in età prescolare - dello sviluppo del Sistema Nervoso Centrale. I disturbi dello sviluppo neurologico determinano menomazioni nel funzionamento personale, sociale, accademico e / o professionale. Questa definizione ombrello include condizioni cliniche come disabilità intellettive (vari livelli di gravità), ritardo globale dello sviluppo psicomotorio, disturbi della comunicazione, disturbi del linguaggio scritto e parlato, disturbi della fluidità del linguaggio, disturbo dello spettro autistico, disturbo da deficit di attenzione con o senza iperattività, disturbi specifici del linguaggio, disturbi specifici dell'apprendimento, disturbi motori e della coordinazione, disturbo stereotipato del movimento e da tic. La gamma di disturbi dello sviluppo neurologico può essere considerata si estende da menomazioni molto specifiche dell'apprendimento o del controllo delle funzioni esecutive a menomazioni globali delle abilità sociali o dell'intelligenza. Spesso, un singolo disturbo è combinato con altri disturbi, come nel caso delle persone con disturbo dello spettro autistico, che, a volte, presentano anche disabilità intellettiva. La genetica dei Disturbi dello Sviluppo Neurologico inizialmente si è concentrata su quello che una volta era definito Ritardo Mentale, ora Disabilità Intellettiva. La sindrome di Down e la trisomia 21 sono stati i primi esempi di fenotipo e genotipo associati alla disabilità intellettiva. Successivamente, l'andamento dell'innovazione tecnologica ha reso note prima le aberrazioni cromosomiche riconoscibili con il cariotipo e associate alla Disabilità Intellettiva, poi le sindromi da microdelezione con l'avvento della FISH e successivamente le sindromi da squilibrio genomico con l'avvento del CGH e SNP Array. Nel campo delle sindromi monogeniche con Disturbo dello Sviluppo Neurologico, il passaggio dal Sanger Sequencing al processo di Next Generation Sequencing, con Whole Exome Sequencing e Whole Genome Sequencing, ha portato ad un costante aumento del riconoscimento di nuove sindromi monogeniche. Allo stesso modo, da un punto di vista fenotipico, la scoperta che gli stessi geni erano patogeni per più di un disturbo dello sviluppo neurologico e spesso andavano in comorbilità con epilessia e genodermatosi, ha portato a un approccio più ampio, non più focalizzato solo sulla disabilità intellettiva. Questo progetto si propone di indagare e identificare nuove eziologie genetiche per vecchi fenotipi come i disturbi dello sviluppo neurologico, utilizzando i più avanzati metodi di laboratorio e l'approccio fenotipico, insieme al contributo di collaborazioni nazionali ed internazionali di esperti di ricerca in questo campo.

Background:

Neurodevelopmental Disorders (NDDs) are defined by DSM5 as clinical conditions arising in the developmental term of the Central Nervous System. The onset is usually in the first stages of development, often in the pre-schooling age. NDDs cause impairments in personal, social, academic and/or occupational functions. Within such umbrella definition, clinical conditions such as Intellectual Disability, Global Developmental Delay, Communication Disorders, Written and Spoken Speech Disorders, Word Fluency Disorders, Autism Spectrum Disorder, Attention Deficit with or without Hyperactivity, Speech Specific Disorders, Learning Specific Disorders, Motor Disorders, Coordination Developmental Disorder, Stereotyped Movement Disorder and Tic Disorders are included. The range of NDDs may be considered variable between two ends, from very specific impairments of learning or control of executive functions to the global impairment of social abilities or intelligence. Single disorders frequently combine among each other, such as, for instance, in the case of persons with Autism Spectrum Disorder, often showing Intellectual Disability. The genetics of NDDs initially focused on what one time was called Mental Retardation, and now is defined as Intellectual Disability. Down Syndrome and Trisomy 21 were first examples of phenotype and genotype associated to Intellectual Disability. Subsequently, the course of technological innovation unveiled chromosomal abnormalities recognizable with the karyotype and associated to Intellectual Disability, then microdeletion syndromes with the advent of FISH, and subsequently the syndromes with genomic unbalancing with the use of CGH and SNP Array. Within the monogenic

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

syndromes with NDDs, the path from Sanger Sequencing to the high throughput of Next Generation Sequencing with Whole Exome Sequencing and Whole Genome Sequencing has led to a constant increase of the recognition of new monogenic syndromes. Meanwhile, the understanding that same genes could be pathogenic for more than one NDD, and often for epilepsy and genodermatoses or rare diseases, has led to a wider approach, not only focused on Intellectual Disability.

Hypothesis and Significance: The hypothesis set in this project is that hundreds of genes linked to NDDs are still unknown. Their recognition would focus on an ever more specific and peculiar clinical approach to patients with NDDs.

Specific Aims: This wide project aims at the search for and recognition of new genetic etiologies for old phenotypes such as NDDs, using the most up-to-date laboratory and phenotype approach techniques, not disregarding the multiplying effect of research networks.

Expected outcomes: Recognition of new genes linked to NDDs.
Definition of new genetic syndromes including NDDs.

Significance and Innovation: The evidence of new genes linked to NDDs and the uncovering of new genetic syndromes including NDDs could prompt a significant increase of scientific knowledge. The innovative approach needed to reach such results will bear on the systemic set up of an international network which will apply the most up to date laboratory and clinical phenotyping techniques.

Translational relevance: Quality of Life in patients affected by the new genetic syndromes with NDDs will be increased by the improved understanding of their disease. The increased knowledge will improve the health treatments given by the NHS, focusing ever more on the endophenotype of the patient with NDDs.

04 : Coinvolgimento metabolico e neuromuscolare nei disordini del neurosviluppo

Responsabile: Scuderi Carmela

Programma:

Parole chiave: Disordini del Neurosviluppo; NGS

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Developmental Brain Disorders - DBD

Descrizione: In questo studio intendiamo arruolare ogni anno circa 200 soggetti con disabilità intellettiva o altri disturbi del neuro sviluppo afferenti all'UOS di malattie Neuromuscolari e all'UOC di Pediatria e Genetica. Questi pazienti saranno sottoposti a dettagliate indagini cliniche e strumentali come descritto di seguito: - Raccolta anamnesica e costruzione dell'albero genealogico. - Esami fisici: ricerca di dismorfismi, valutazione dei parametri auxologici. - Valutazione neuropsichiatrica ed esame neurologico. - Indagini neuroradiologiche: Risonanza magnetica cerebrale e/o TC. I soggetti in cui verranno riscontrati segni clinici indicativi di un coinvolgimento neuromuscolare o metabolico saranno sottoposti ad approfondimenti diagnostici che includeranno: - Indagini neurofisiologiche: Elettromiografia e studio della conduzione nervosa. - Elettroencefalogramma (EEG). - Analisi del sangue: aminoacidi plasmatici, lattato e piruvato, test di funzionalità epatica, emocromo completo, creatinfosfochinasi e cariotipo. - Analisi istologiche, istoenzimatiche e biochimiche su campioni di muscolo prelevati dal quadricipite destro mediante la metodica della biopsia muscolare ad ago - Analisi genetico-molecolari: Sulla base del fenotipo clinico osservato, i vari casi saranno sottoposti ad uno screening di primo livello che prevede array-CGH, indagini genetico-molecolari specifiche per singolo gene o analisi di pannelli di geni mediante la tecnologia Next Generation Sequencing. Per tutti quei casi irrisolti per i quali non si sia identificata una causa genetica, si effettuerà il sequenziamento dell'intero esoma. Le varianti con probabile ruolo patogenetico, identificate mediante NGS, saranno confermate dal sequenziamento Convenzionale Sanger; inoltre, per prevederne la possibile patogenicità, verranno utilizzati, da una parte, software dedicati come Polyphen e Mutation Taster, in grado di

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

valutare l'effetto che le varianti hanno sulla struttura e sulla funzione delle rispettive proteine.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Durante questo primo anno, sono stati reclutati 200 soggetti con disabilità intellettiva o altri disturbi del neurosviluppo afferenti all'UOS di malattie Neuromuscolari e all'UOC di Pediatria e Genetica. Questi soggetti sono stati sottoposti a dettagliate indagini cliniche e strumentali che prevedevano: raccolta anamnesica e costruzione dell'albero genealogico; esami fisici (ricerca di dismorfismi, valutazione dei parametri auxologici); valutazione neuropsichiatrica ed esame neurologico; indagini neuroradiologiche (risonanza magnetica cerebrale e/o TC).

In 45 soggetti sono stati riscontrati segni clinici indicativi di un coinvolgimento neuromuscolare o metabolico e per tale ragione sottoposti ad approfondimenti diagnostici tra cui: indagini neurofisiologiche (elettromiografia e studio della conduzione nervosa); EEG; analisi del sangue (aminoacidi plasmatici, lattato e piruvato, test di funzionalità epatica, emocromo completo, creatinfosfochinasi e cariotipo); analisi istologiche, istoenzimatiche e biochimiche su campioni di muscolo prelevati dal quadricipite destro mediante la metodica della biopsia muscolare ad ago.

Sulla base del fenotipo clinico osservato, i vari casi sono stati sottoposti ad indagini genetico-molecolari specifiche, che hanno permesso di individuare due pazienti con mutazione nel gene PDHA1 responsabile del Deficit della subunità E1-alfa della piruvato deidrogenasi, 2 fratelli con mutazioni note nel gene ATM responsabile dell'ataxia telangectasia, 5 soggetti con distrofinopatia X-linked dovuta a delezioni di entità variabile nel gene DMD.

Tra i casi irrisolti per i quali non è stata identificata una causa genetica, è stato eseguito il sequenziamento dell'intero esoma in 10 soggetti, permettendo di identificare mutazioni causative in 3 pazienti. Nel dettaglio, in una paziente con profonda disabilità intellettiva, atassia, dismorfismi e difetti dello sviluppo del SNC, abbiamo identificato le varianti c.182dupC (p.G62Wfs*17) e c.1480+4Adel nel gene TCTN3 responsabile della Sindrome di Joubert. Queste varianti, ereditate rispettivamente dalla madre e dal padre, non sono mai state segnalate in precedenza e l'analisi predittiva in silico riporta entrambe come deleterie. Abbiamo inoltre identificato la variante missense c.757C>T (p.R253W) nell'esone 7 del gene TOE1 (NM_025077) in condizioni di omozigosi in due soggetti, fratello e sorella. La variante risulta ereditata dai genitori, che sono quindi portatori sani. Questa mutazione è riportata su HGMD (The Human Gene Mutation Database - Professional 2022.1) come causativa di malattia (DM) in quanto descritta in eterozigosi composta in un soggetto con ipoplasia pontocerebellare tipo 7 (PCH7) [Lardelli (2017) Nat Genet49:457]. La PCH7 è caratterizzata da deterioramento neurologico, atrofia/ipoplasia del ponte e del cervelletto, ipotonia muscolare ed anomalie respiratorie, associate ad ipogonadismo. Il fenotipo dei nostri pazienti è compatibile con PCH7.

Attività previste Attività 2023:

Per il secondo anno ci si propone di proseguire l'arruolamento di ulteriori 200 soggetti con disabilità intellettiva o altri disturbi del neuro sviluppo afferenti all'UOS di malattie Neuromuscolari e all'UOC di Pediatria e Genetica. Questi pazienti saranno sottoposti a dettagliate indagini cliniche e strumentali al fine di individuare i soggetti con segni clinici indicativi di un coinvolgimento neuromuscolare o metabolico e, sulla base del fenotipo clinico osservato, sottoporli ad uno screening di primo livello che prevede array-CGH, indagini genetico-molecolari specifiche per singolo gene o analisi di pannelli di geni mediante la tecnologia Next Generation Sequencing. Per tutti quei casi irrisolti per i quali non sia stata identificata una causa genetica, si effettuerà il sequenziamento dell'intero esoma.

Le varianti con probabile ruolo patogenetico, identificate mediante NGS, saranno confermate dal sequenziamento Convenzionale Sanger; inoltre, per prevederne la possibile patogenicità, verranno utilizzati, da una parte, software dedicati come Polyphen e Mutation Taster, in grado di valutare l'effetto che le varianti hanno sulla struttura e sulla funzione delle rispettive proteine.

Background: Neurodevelopmental disorders (NDD) are characterized by an inability to reach cognitive, emotional, and motor developmental milestones. Typically, NDD are associated with the disruption of the tightly coordinated events that lead to brain development. They have a heterogeneous etiology and lead to impaired cognition, communication, adaptive behavior, and psychomotor skills. NDD include autism spectrum disorder (ASD), intellectual disability (ID), attention deficit hyperactivity disorder, and epilepsy. Frequently, a combination of two or more of these disorders is observed. Different types of mutation have been associated with NDD, including chromosomal rearrangements, copy number variations, small indels, and point mutations. The identification of the potential genetic causes of NDD is vital for understanding the molecular mechanisms responsible for the onset of these disorders and for the delineation of a genotype-phenotype correlation that could help to monitor the progress of the disorder and to foresee future complications. The implementation of next-generation sequencing (NGS) technologies in the diagnostic flowchart of NDD has increased the percentage of patients who receive a molecular diagnosis. Despite the

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

numerous NDD-causative genes identified, many individuals with NDD still do not receive a molecular diagnosis. In this scenario, it is very interesting the various evidence about the close correlation between the development and function of muscle and those of central nervous system (CNS). In Duchenne muscular dystrophy, for example, although muscle symptoms represent the predominant and most devastating clinical manifestation, a high incidence of cognitive disorders and cerebral atrophy is observed and abnormalities of brain development such as pachygyria and heterotopia have been demonstrated by some autopsy studies (Taylor et al., 2010; Anderson et al., 2002). Some forms of congenital muscular dystrophy, such as Fukuyama's disease and Walker-Walburg syndrome, show marked clinical signs of CNS involvement such as very serious delay or absence of psychomotor acquisitions, often intractable epilepsy, central motor deficits; the pathological correlate of these symptoms is represented by complex malformations affecting the cerebral cortex with the picture of lissencephaly type II, cerebellum, brain stem, etc. (Mercuri et al. 2009). Other diseases in which the muscle is not primarily involved, but in which typical alterations to muscle biopsy can be observed are ceroidlipofuscinosis, lysosomal accumulation diseases, Lafora disease, neuroaxonal dystrophy, etc. Over the years, the study of several hundred patients has allowed us to suspect that neuromuscular and metabolic involvement may be present in patients with NDD, in a surprisingly high way, beyond expectations based on data in the literature in this area. Thus, it was possible to diagnose several patients with ID, ASD and other NDD, presenting with clinical signs suggestive of a neuromuscular or a metabolic disorder, such as muscle tone alterations, dysmorphisms, epilepsy, ocular signs, abnormal EEG, white matter anomalies, cerebral and/or cerebellar atrophy, CNS malformations and cognitive and/or neurological deterioration. The clinical and scientific results obtained showed how the study of neuromuscular aspects provides an important qualitative enrichment of the diagnostic and research activity in NDD, intervening on the difficult etiopathogenetic classification of these disorders and allowing the identification of clinical and genetic phenotypes never described in literature.

References

Anderson JL, et al. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain* 2002;125:4-13.

Mercuri E, et al. Congenital muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan: a population study. *Neurology* 2009;72:1802-9.

Taylor PJ, et al. Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 2

Hypothesis and Significance: The study of clinical and genetic aspects in these types of diseases will lead us to the identification of new genotype-phenotype correlations and, possibly, of new genes involved in such neurodevelopment disorders and to better understand the underlying pathogenetic mechanisms.

Specific Aims: The activity of the Neuromuscular Diseases Unit is aimed at identifying the genetic causes, at understanding the pathogenetic mechanisms and the genotype-phenotype correlations underlying rare diseases, with particular attention to neurodevelopmental disorders in order to reach a correct diagnosis, adequate treatment and careful assessment of recurrence risks.

Expected outcomes: Based on our preliminary data, we expect to identify new genotype-phenotype correlations and, possibly, new genes implicated in neuromuscular or metabolic pathways and to better understand the underlying pathogenetic mechanisms.

Significance and Innovation: Clinical and laboratory work aimed at identifying biological markers of neuromuscular and metabolic involvement in neurodevelopmental disorders has an important impact on the diagnosis and management of such patients.

Translational relevance: Carrying out these investigations is extremely important also for the pharmacological and genetic therapies that are becoming available and with an enormous impact for the life of subjects with neuromuscular/neurodegenerative diseases.

05 : Investigazione delle regioni di omozigotà nei disturbi del neurosviluppo

Responsabile: Fichera Marco

Programma:

Parole chiave: runs of homozygosity; neurodevelopmental diseases; whole exome sequencing; recessive; identical by descent; consanguinity

Altri enti coinvolti: Genetica Medica Policlinico di Catania

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Tipologia: Metodologica

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Developmental Brain Disorders - DBD

Descrizione: Le malattie autosomiche recessive hanno un ruolo importante nel panorama delle disabilità intellettive (DI) e in generale dei disordini del neurosviluppo (DNS). L'endogamia è da tempo conosciuta come un fattore di rischio per le malattie mendeliane recessive per l'aumentata probabilità che un individuo riceve dai propri genitori tratti di genoma identici recanti potenziali alleli deleteri in omozigosi. Molti dei geni recessivi attualmente conosciuti sono stati identificati tramite studi di linkage o di "homozygosity mapping" in famiglie consanguinee. Tuttavia, il limite di quest'approccio risiede nella difficoltà, soprattutto nelle società occidentali, di potere investigare famiglie consanguinee con un sufficiente numero d'individui. Inoltre, data la ristrettezza dei nuclei familiari, risulta spesso impossibile dall'esame del pedigree familiare distinguere una modalità di segregazione autosomica dominante con mutazione de novo da una recessiva. Recenti studi hanno dimostrato, anche in individui appartenenti a famiglie non consanguinee, la presenza di ampie regioni di omozigosità denominate ROH (runs of homozygosity). Le ROH possono essere di lunghezza variabile: la maggior parte di quelle di piccola taglia (< 2-3 Mb) sono probabilmente dovute a regioni genomiche con un forte linkage disequilibrium mentre quelle più grandi sembrano essere dovute ad una doppia segregazione (dal lato paterno e materno) di regioni identiche ereditate dai genitori da un comune avo. Queste ultime ROH sono definite come identiche per discendenza (IBD: identical by descent). Diversi studi in letteratura hanno dimostrato che queste ROH sono arricchite in varianti deleterie e che le ROH sono più frequenti in soggetti con determinate malattie geneticamente eterogenee. Da quanto detto risulta che l'identificazione di nuovi geni coinvolti nell'insorgenza di malattie autosomiche recessive è più probabile analizzando individui affetti con ampie ROH dovute a segmenti genomici IBD. Ciò è ancora più vero per malattie rare per le quali la bassa frequenza degli alleli deleteri favorisce l'ipotesi che essi siano presenti in omozigosi nelle ROH. Alla luce di queste considerazioni, le eventuali varianti candidate ottenute in queste regioni tramite analisi WES (whole exome sequencing) in questi individui acquistano una particolare robustezza qualora ritrovate in porzioni genomiche caratterizzate da ROH IBD. Noi ipotizziamo dunque che le ROHs rappresentino una *maniglia* genetica per l'identificazione di fattori di rischio recessivi anche nei pazienti con DNS senza consanguineità prossima. Inoltre, recenti studi hanno messo in luce come cause oligogeniche di DNS siano spesso dovute a varianti contenute nelle ROH. Per ultimo, ROH isolate possono essere la spia di disomie uniparentali segmentali non correttamente identificate. Nel corso della ricerca, ci prefiggiamo i seguenti obiettivi:

- 1) Identificare nuovi geni malattie coinvolti in forme recessive di DNS in una popolazione a basso grado di consanguineità, valutare la presenza di varianti deleterie o ipomorfe secondo il modello di ereditarietà oligogenica, investigare la possibile presenza di UDP in cromosomi con ampie ROH isolate in soggetti non consanguinei.
- 2) Validare le varianti candidate tramite screening mirato NGS su un ampio gruppo di pazienti affetti da DNS.
- 3) Stabilire una mappa di frequenza delle ROH nella popolazione Italiana allo scopo di favorire la prioritizzazione di ROH rare per altri studi su malattie recessive.

Bibliografia pertinente

- 1) Mitchell K.J The Genetics of neurodevelopmental disease.. *Curr Opin Neurobiol.* 2011 Feb;21(1):197-203
- 2) Musante L, Ropers HH Genetics of recessive cognitive disorders. *Trends Genet.* 2014 Jan;30(1):32-9.
- 3) Gandin I, Faletra F, Faletra F, Carella M, Pecile V, Ferrero GB, Biamino E, Palumbo P, Palumbo O, Bosco P, Romano C, Belcaro C, Vozzi D, d'Adamo AP. Excess of runs of homozygosity is associated with severe cognitive impairment in intellectual disability. *Genet Med.* 2015 May;17(5)
- 4) Giacomuzzi E, Gennarelli M, Minelli A, Gardella R, Valsecchi P, Traversa M, Bonvicini C, Vita A, Sacchetti E, Magri C Exome sequencing in schizophrenic patients with high levels of homozygosity identifies novel and extremely rare mutations in the GABA/glutamatergic pathways.
- 5) Gamsiz ED, Viscidi EW, Frederick AM, Nagpal S, Sanders SJ, Murtha MT, Schmidt M; Simons Simplex Collection Genetics Consortium, Triche EW, Geschwind DH, State MW, Istrail S, Cook EH Jr, Devlin B, Morrow EM Intellectual disability is associated with increased runs of homozygosity in simplex autism. *Am J Hum Genet.* 2013 Jul 11;93(1):103-9
- 6) Gibson J, Morton NE, Collins A Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet.* 2006 Mar 1;15(5):789-95
- 7) Pemberton TJ, Absher D, Feldman MW, Myers RM, Rosenberg NA, Li JZ. Genomic patterns of homozygosity in worldwide human populations *Am J Hum Genet.* 2012 Aug 10;91(2):275-92
- 8) Hildebrandt F, Heeringa SF, Rüschenhoff F et al A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS Genet.* 2009 Jan;5(1):e1000353.
- 9) Jiadi W, Hongyan C, Brittany Grommisch et al Detecting regions of homozygosity improves the diagnosis of pathogenic

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

variants and uniparental disomy in pediatric patients Am J Med Genet A. 2022

10) Mitani T , Isikay S , Gezdirici A et al High prevalence of multilocus pathogenic variation in neurodevelopmental disorders in the Turkish population Am J Hum Genet. 2021 Oct 7;108(10):1981-2005

11) Fichera M, Failla P, Saccuzzo L, Miceli M et al Mutations in ACTL6B, coding for a subunit of the neuron-specific chromatin remodeling complex nBAF, cause early onset severe developmental and epileptic encephalopathy with brain hypomyelination and cerebellar atrophy Hum Genet. 2019 Feb;138(2):187-198

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Abbiamo selezionato 55 pazienti e relativi genitori (ove disponibili) analizzati per SNP-array con le seguenti caratteristiche: Casi isolati, negativi all'analisi di CNV o altri test genetici, genitori non affetti, prelievi di sangue periferico disponibili dei genitori e di almeno un altro fratello/sorella del paziente. Nei pazienti selezionati deve essere stata evidenziata almeno una regione con ROH > 3 Mb.

Questo gruppo di pazienti è supposto essere arricchito per malattie genetiche con segregazione recessiva. Su 25 dei pazienti analizzati abbiamo effettuato l'analisi whole exome sequencing, considerando nella pipeline di prioritizzazione anche forme dominanti o X-linked. Nei trios sottoposti ad investigazione, abbiamo identificato 8 pazienti con mutazioni classificate come patogenetiche su geni noti per essere associati a malattie compatibili con i fenotipi dei pazienti. Tra queste forme, 5 erano a segregazione recessiva mentre 3 presentavano una segregazione autosomica dominante. I propositi di altre 5 famiglie presentavano mutazioni in omozigosi con predittività "pathogenic" o "likely pathogenic" su tratti ROH precedentemente identificati. In 11 dei restanti 12 pazienti, la nostra analisi non è stata in grado di evidenziare mutazioni candidate. Infine, in un trio è stata identificata una mutazione frameshift in omozigosi in un gene non ancora associato a malattia. Allargando il pedigree familiare abbiamo individuato altri 7 membri caratterizzati da un fenotipo sovrapponibile a quello del proposito. Questi pazienti sono sottoposti ad analisi SNP-array che ha confermato in tutti la presenza della regione di omozigosità in cui mappa il gene candidato e ha evidenziato una struttura familiare con numerosi matrimoni tra partner consanguinei. La successiva ricerca della mutazione per sequenziamento Sanger ha evidenziato la mutazione biallelica in tutti gli individui affetti. È stata quindi eseguita analisi di linkage sul pedigree espanso che ha portato alla determinazione di un lodscore di 5.3, dando conferma di significatività statistica di associazione tra il genotipo dei pazienti e la malattia. La stesura del draft della pubblicazione di questo nuovo gene malattia è attualmente in corso e sarà completata appena terminati i saggi funzionali in itinere. I dati delle ROHs sono stati messi a disposizione della comunità scientifica tramite il loro inserimento nel database delle copy number dell'IRCCS di Troina.

Attività previste Attività 2023:

Nel corso del successivo anno della ricerca prevediamo di analizzare con le stesse metodiche i rimanenti 30 trios selezionati. Allo scopo di validare le varianti candidate messe in luce nel corso del primo anno della ricerca, Sarà inoltre disegnato un saggio NGS su un pannello di geni con mutazioni candidate come patogenetiche identificate nel corso dello studio e cominciato lo screening di questi geni su almeno 300 pazienti con disturbi del neurosviluppo, ben caratterizzati clinicamente ma a tutt'oggi privi di diagnosi genetica. Nello stesso anno sarà finalizzato l'articolo scientifico sul nuovo gene malattia identificato e completata l'immissione dei dati ROH nel database dell'IRCCS di Troina. Infine, prevediamo di fornire una mappa della struttura genomica della popolazione generale in termini di ROH.

Background:

Neurodevelopmental disorders (NDDs), which include intellectual disabilities (ID) and Autism, represent one of the major social, economical and medical issues (1). NDDs are predominantly genetic in origin and may be classified in mendelian autosomal dominant (AD), autosomal recessive (AR), X-linked (XL), or in complex diseases. In the last few years, the role of high-penetrant risk factors in NDDs has been strengthened by the advent of NGS that has enabled the study of the entire exome/genome of an individual in a timely and cost effective manner. The power of NGS in identifying the underlying genetic causes of NDDs has been demonstrated by several recent whole exome sequencing (WES) studies on dominant alleles which, given the usually extreme reduced fitness of affected individuals, are often de novo events that may be detected by comparing genotypes of proband and parents. Although de novo variants are not per se causative mutations, in silico analysis and further identification of other mutations affecting the same candidate gene in patients with the same or similar phenotype, may allow a strict association with the disease. On the contrary, the discovery of genes involved in ARNDDs (reviewed in 2) is considerably slower than in AD-NDDs. AR-NDDs are thought to be rare in western countries because of a low rate of parental consanguinity. Moreover, given the small sizes of families in those populations, AR-NDDs often present as isolated cases that do not allow a segregation analysis of possible recessive candidate variants. Although AD-NDD probably is the predominant form in western countries, recent estimates suggest that AR-NDDs may account for a non negligible part of sporadic cases that cannot be discriminated from AD-NDDs. Indeed, when considering an average of two children per family and a 5% of familial cases within ID patients referred to genetic services in central Europe, it has been calculated that recessive forms of ID may account for

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

20% of cases in those countries. Although every month new recessive genes are reported in the literature, several considerations suggest that thousand of recessive genes have yet to be identified. Interestingly, recent studies have demonstrated an increased rate of runs of homozygosity (ROH) in autism, schizophrenia and ID in outbred populations (3,4,5). ROHs are long tracts of consecutive homozygous polymorphisms in an individual, that can be readily evidenced by SNP-array. Patterns of ROH distribution among different populations are not uniform and may occur by several mechanisms including recombination rates, inbreeding levels and positive selection. ROHs can be further divided in short (tens of Kb), medium (hundreds of kb), and long (thousands of kb). Interestingly short and medium ROHs are present at high frequencies in every population but, although to a much less extent than in inbred population, very long ROH are also present in outbred population (reviewed in 6 and 7). While most of the latter probably results from hotspot chromosomal regions characterized by low recombination rates, leaving unbroken long ancient ancestral segments over generations, others may reflect common ancestral haplotype in parents, not yet disrupted by recombination events due to a relatively short distance in term of meiosis from the common parental ancestor. In a given population these long ROHs may thus be splitted in two categories based on their frequencies: high frequency ROHs i.e. ROHs occurring several times in the same chromosomal regions, and very rare interspersed ROHs which may reflect a recent parental relatedness. When considering ROH analysis in patients, the relative increase of homozygous tracks compared with general population controls, probably accounts for an enrichment of homozygous risk factors associated with the disease and represent specific genomic targets that warrant further investigation.

Hypothesis and Significance: We hypothesize that ROHs analysis may represent a genetic handle to identify recessive risk factors for NDDs in patients from outbred populations. Although in those populations most patients with recessive NDDs will be isolated cases, indistinguishable from dominant forms, and that compound heterozygous mutations will be quite common in such patients, we think that a specific research for new recessive genes in NDDs should take advantage from ROH information for different reasons: 1) As part of the ROHs represent chromosomal segments identical by descent (IBD), a rare deleterious variant in an IBD segment may be in a homozygous form with a probability equal to its frequency, far greater than the square of its frequency expected for non-IBD segregating mutations. This consideration both implies that ROH analysis in NDD patients may allow to identify a subset of them enriched for recessive forms and that NGS analysis in these patients should mainly focus in homozygous candidate variants occurring in the ROH regions, given the posterior higher probability for a recessive deleterious variant to map in these regions (8). 2) Although patients carrying compound heterozygous mutations are expected to be more common in outbred populations, there is no simple way in isolated cases to discern these AR-NDD individuals from AD-NDDs patients. Moreover, compound heterozygous variants may be overlooked easier than homozygous ones by NGS analysis. 3) Isolated ROHs in nonconsanguineous families may hidden segmental UPD (9). 4) Oligogenic inheritance has proven to be driven by homozygous variants in ROH regions (10). 5) Data from ROH is often available since most of NDD patients underwent copy number analysis through SNP-array in the routine diagnostic setting. Given these considerations, we plan to investigate the role of recessive alleles in NDDs focusing on patients carrying long ROHs that may reflect cryptic parental consanguinity. Considering that ROHs have different patterns of occurrence across the genome and different geographic distributions (4), we believe that another key point of our research is the delineation of a frequency ROH map in the Sicilian population in order to prioritize uncommon ROH regions for further NGS studies on different recessive diseases (Aim 3). ROH hotspots (i.e. ROHs frequently observed in determined genomic regions) may represent either low-recombination regions or regions harboring loci under positive selection that, when identified in the NDD patients, should be filtered out as they would carry recessive alleles less likely than low frequency ROHs.

Specific Aims: Specific Aim 1:
To investigate the burden of ROH and to discover new candidate genes potentially involved in recessive NDDs in outbred population.
Specific Aim 2:
To validate the candidate variants by screening by a targeted NGS assay a second large cohort of NDD individuals.
Specific Aim 3:
To establish a frequency ROH map in the Italian population in order to prioritize uncommon ROH regions for further NGS studies on different recessive diseases

Expected outcomes: We think that the NDD individuals we will select would have an overall probability to include recessive NDDs greater than that of the rest of unselected patients. Although a correct estimate of this probability would depend on several parameters that are not well established such as the proportion of genetically determined NDDs and the amount of complex NDDs in respect of mendelian ones, we are confident to identify several strength candidate genes for recessive

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

NDDs. On the other hand, while our principal focus is represented by recessive alleles, we will not use a prior unique mendelian model in our analysis and hence we expect to also identify individuals carrying de novo dominant mutations and some of them may affect genes not yet associated with NDDs.

Significance and Innovation: This study would represent a novel strategy for the identification of recessive genes in western countries characterized by small pedigrees and low grade of inbreeding. The discovery of novel genes underlying the NDDs is important both from the research side giving highlights to our largely incomplete knowledge about pathways and gene interactions in NDDs, but also from a clinical point of view, where the knowledge of the molecular basis of the disease may improve the genetic counseling in terms of recurrence risk, follow-up and possibly new therapies. The new genes that we are confident to identify would enhance the NGS-targeted assays that we currently use in the diagnostic setting and, more importantly, may help to recognize new syndromes through a reverse phenotypic strategy. Finally, we think that a local map of ROHs may also improve the identification of the genetic causes of recessive diseases beyond NDDs.

Translational relevance: We believe that the recessive causes of NDDs are underestimated in western countries. The identification of novel NDD recessive genes will give new insights on their function, into the knowledge of the related pathways that in turn may open the way for possible new therapies. In the meanwhile, when considering the individual patient and family, this will improve the genetic counseling and the assessment of the recurrence risk. Although the advent of NGS has greatly improved the genetic diagnosis, many NGS targeted assays still have a low detection rate due to lack of knowledge of many causative genes and poor information on the geographical epidemiology of causative alleles. We hope to be able to contribute to fill the gap in our territory. Finally, we firmly think that sharing data is prominent in the genome era. In this regard, we would like to add ROH data on the public database for CNV analysis that we implemented years ago and which is used by more than 50 labs throughout Italy.

Linea di ricerca n. 4 : DISTURBI COGNITIVI E MALATTIE NEUROPSICHIATRICHE: IDENTIFICAZIONE DI NUOVI BIOMARCATORI E NUOVI TARGET FARMACOLOGICI

01 : Nuove strategie per i processi di drug discovery e per il trattamento farmacologico dei disturbi cognitivi associati con le malattie neuropsichiatriche

Responsabile: CARACI FILIPPO

Programma:

Parole chiave: Risk factors, cognitive disorders, dementia, Alzheimer, amyloid, neurodegeneration, neuroprotection, pharmacological treatment, depression, drugs, glutamate, opioid system, drug interactions, cognitive disorders, cell cycle, PIN1, microfluidics, TGF- β 1, biological markers, cognition, innovative formulations

Altri enti coinvolti: Dipartimento di Scienze del Farmaco e della Salute, Università di Catania (Prof.ssa Agata Copani)
Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania (Prof. Grasso)
Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, Università di Catania (Prof. Grosso)
Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Pavia, (Prof. Cristina Lanni).

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Terapeutica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Clinical Neuroscience and Neurodegeneration - CNN

Descrizione: I deficit cognitivi sono presenti in diversi disturbi neuropsichiatrici, dalla depressione alla malattia di Alzheimer, con un impatto forte sulla qualità della vita. Lo sviluppo di nuovi farmaci per i disturbi cognitivi potrebbe apportare miglioramenti significativi nella qualità della vita e ridurre il futuro carico economico sul sistema sanitario nazionale. Lo studio delle basi fisiopatologiche rappresenta la prima tappa essenziale per aumentare le possibilità di sviluppare terapie disease-modifying che vadano oltre le attuali terapie sintomatiche. Il primo scopo di tale ampio progetto è l'identificazione dei meccanismi molecolari e patogenetici

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

che sottendono i disturbi cognitivi associati a malattie neuropsichiatriche come la depressione e l'AD al fine di sviluppare nuovi farmaci psicotropi ad azione neuroprotettiva in grado di correggere tali alterazioni e promuovere la sopravvivenza neuronale ed i fenomeni di plasticità sinaptica.

In tale contesto un primo specifico target farmacologico che sarà oggetto del presente progetto è la via del TGF-beta1, il cui deficit gioca un ruolo centrale nella fisiopatologia dei deficit cognitivi sia nella depressione che nella malattia di Alzheimer. La depressione rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di AD ed una stretta connessione esiste tra depressione resistente al trattamento e sviluppo di declino cognitivo lieve e successivamente AD, con in particolare la compromissione della via del TGF-beta1 quale target farmacologico comune alle due patologie. Di primaria importanza, in questo quadro generale, saranno gli studi del nostro gruppo rivolti allo studio degli effetti dello stress prenatale in ratte gravide per la successiva induzione nella progenie in adolescenza di un fenotipo depressivo con deficit cognitivi e l'eventuale effetto in tale modello di antidepressivi di seconda generazione come la fluoxetina, al fine di comprendere se tali farmaci possono revertire sia i sintomi affettivi che cognitivi, attraverso la stimolazione della via del TGF-beta1.

In accordo a questo scenario un secondo obiettivo del progetto è identificare nuovi farmaci in grado di promuovere il rilascio di TGF-beta1. Per tale ragione studieremo nuove formulazioni o combinazioni di farmaci tra cui sia la fluoxetina che principi attivi naturali, da soli o in combinazione, come nuovi tool per stimolare la via del TGF-beta1 prima in vitro e poi successivamente in modelli sperimentali di malattie neuropsichiatriche caratterizzate da deficit cognitivi.

L'attivazione del ciclo cellulare rappresenta un evento primario nella fisiopatologia della malattia di Alzheimer con un ruolo centrale della pol-beta nella sintesi ectopica del DNA e la conseguente morte neuronale. Altri fattori come PIN1 sono coinvolti nella neurodegenerazione indotta dagli oligomeri di Abeta già nella prima fase di malattia, ma non sono stati mai condotti studi parallelamente sia nei modelli preclinici che nei PBMC ottenuti dai pazienti AD. Un terzo obiettivo del presente progetto è pertanto lo studio dei determinanti molecolari che legano l'attivazione di pol-beta all'induzione di claspina, nonché lo studio del ruolo di PIN e della sua eventuale down-regulation sia nei modelli in vitro che in PBMC ottenuti da pazienti.

Il diabete di tipo II è un noto fattore di rischio per lo sviluppo di malattia di Alzheimer ed è stato ipotizzato che gli aumentati livelli di insulina in tale patologia, la saturazione dell'enzima Insulin Degrading Enzyme (IDE) con rallentamento della degradazione degli oligomeri di Abeta da parte di IDE possano contribuire alla comparsa dei deficit cognitivi nell'AD. Il nostro gruppo di ricerca analizzerà i possibili effetti della carnosina, un peptide endogeno ad attività neuroprotettiva, sull'IDE per comprendere se esso possa aumentarne l'attività favorendo la degradazione di Abeta.

Diversi studi recenti, inclusi quelli del nostro gruppo di ricerca, dimostrano l'importanza della dieta mediterranea ed in particolare dei polifenoli nella prevenzione del declino cognitivo associato all'età ed anche nel declino cognitivo lieve. Il nostro gruppo di ricerca analizzerà pertanto i determinanti molecolari dell'attività neuroprotettiva dei polifenoli, inclusi i possibili effetti sulla via del TGF-beta1, al fine di comprendere il potenziale terapeutico di tali principi attivi naturali nel trattamento dell'AD.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Eventi stressanti, soprattutto durante il periodo prenatale, possono aumentare il rischio di sviluppare depressione in adolescenza, anche se alcuni individui risultano essere resilienti. Utilizzando un modello animale di stress prenatale (PNS) su ratti adolescenti Sprague Dawley nati da ratte gravide esposte a stress durante l'ultima settimana di gestazione, abbiamo dimostrato che i ratti PNS mostrano un comportamento simil-depressivo e deficit di memoria. Mediante analisi molecolari su campioni di ippocampo abbiamo dimostrato un incremento dei livelli di TGF- β 1 e del suo recettore TGF β -R2 e l'attivazione di meccanismi pro-ossidanti con un aumento dei livelli di iNOS, NOX1 e NOX2 nell'ippocampo di ratti resilienti. I nostri risultati suggeriscono che alti livelli di TGF- β 1 e del suo recettore TGF β -R2 possono aumentare la resilienza al PNS di ratti adolescenti, evidenziando che il pathway del TGF- β 1 potrebbe rappresentare un nuovo target farmacologico per prevenire la depressione in adolescenza. Questi risultati sono stati presentati al 41° Congresso Nazionale della Società di Farmacologia. Il valore scientifico e l'uso appropriato del farmaco *z* (Roma, 16-19 Novembre 2022) e pubblicati nella rivista scientifica internazionale Q1 *Frontiers in Pharmacology* (2022 Dec 2 13:1075746. DOI: 10.3389/fphar.2022.1075746), "Prenatal stress induces a depressive-like phenotype in adolescent rats: The key role of TGF- β 1 pathway".

Nel 2022 abbiamo identificato, in collaborazione con l'Università King Abdulaziz di Jeddah, una nuova formulazione e combinazioni di farmaci (diclofenac) e principi attivi naturali (melittina) in grado di stimolare la via del TGF-beta1 da utilizzare in futuro come nuovi tool prima in vitro e poi successivamente in modelli sperimentali di disturbi cognitivi. I risultati di questo studio sono stati pubblicati nella rivista scientifica internazionale Q1 *Pharmacological Research: Eid BG, Alhakamy NA, Fahmy UA, Ahmed OAA, Md S, Abdel-Naim AB, Caruso G, Caraci F. Melittin and diclofenac synergistically promote wound healing in a pathway involving TGF- β 1. Pharmacol Res. 2022 Jan;175:105993. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105993.*

Nel 2023 abbiamo analizzato in colture neuronali i determinanti molecolari (Claspina, Caspase-7) che legano l'attivazione di pol-beta all'innesco della fase S ed alla successiva morte neuronale, quali nuovi target farmacologici per la prevenzione della neurodegenerazione indotta da beta-amiloide.

Nel 2022 il nostro gruppo di ricerca ha analizzato i possibili effetti della carnosina in vitro sull'attività dell'IDE dimostrando

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

che tale peptide ne aumenta l'attività favorendo la degradazione di Abeta. I risultati di questo studio sono stati pubblicati nella rivista scientifica internazionale Q1 ACS Chem Neuroscience: Distefano A, Caruso G, Oliveri V, Bellia F, Sbardella D, Zingale GA, Caraci F, Grasso G. Neuroprotective Effect of Carnosine Is Mediated by Insulin-Degrading Enzyme. ACS Chem Neurosci. 2022 May 18;13(10):1588-1593. doi: 10.1021/acscchemneuro.2c00201.

Nel 2022 abbiamo inoltre analizzato i determinanti molecolari dell'attività neuroprotettiva del didrotanshinone ed il ruolo di prevenzione dei fitoestrogeni sul declino cognitivo nella popolazione anziana del Sud Italia. Infine, abbiamo condotto una meta-analisi su attività fisica e AD, in collaborazione con l'Università di Valladolid con il gruppo del Prof. Alejandro Lozano (J Neurol. 2023 Feb;270(2):711-725. doi: 10.1007/s00415-022-11454-8), dimostrando l'azione protettiva che l'attività fisica esercita sul deficit cognitivo associato all'AD.

Attività previste Attività 2023:

Obiettivo generale del presente progetto è individuare nuovi target farmacologici per il trattamento dei disturbi cognitivi associati a malattie neuropsichiatriche, dalla depressione all'AD, che rappresenta un passaggio essenziale per lo sviluppo di nuovi ed efficaci farmaci in grado di modificare il decorso clinico di questi disturbi con un grande vantaggio per il Sistema Sanitario Nazionale.

Al fine di valutare l'efficacia di un trattamento farmacologico per prevenire o contrastare il fenotipo depressivo e la disfunzione cognitiva indotti dal PNS, testeremo la capacità della fluoxetina, un SSRI in grado di attivare la via del TGF- β 1, in animali adolescenti. In particolare, i ratti vulnerabili saranno trattati con fluoxetina i.p. 10mg/Kg/die per 4 giorni, al termine dei quali valuteremo il fenotipo comportamentale mediante gli stessi test utilizzati prima del trattamento. Le analisi molecolari saranno condotte su campioni di ippocampo e plasma per valutare i livelli del TGF- β 1, del TGF β -R2 e la modulazione dei target pro-ossidanti.

Nel 2023 il nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con il gruppo del Prof. Hampel, analizzerà il ruolo di BACE 1 e BACE 2 come possibili biomarcatori per la predizione della risposta a farmaci disease-modifying nell'ambito della medicina di precisione. Considerata la rilevanza dei disturbi affettivi nella popolazione anziana e la correlazione con i disturbi cognitivi, saranno esaminati sia l'impatto della dieta sui sintomi depressivi che l'efficacia del litio in popolazioni speciali come i pazienti anziani con disturbo bipolare. Quest'ultimo lavoro sarà condotto in collaborazione con il Prof. Fiorillo (Università Vanvitelli) ed il Prof. Sani (Università Cattolica di Roma). Infine utilizzeremo la network analysis per analizzare le possibili relazioni e correlazioni tra sintomi affettivi e sintomi cognitivi nella depressione unipolare e bipolare e la risposta al trattamento farmacologico con antidepressivi e/o stabilizzanti del tono dell'umore.

Background: Cognitive dysfunction is present in Alzheimer's disease as well as in other neuropsychiatric disorders such as depression strongly affecting quality of life. The development of new drugs for cognitive disorders has the potential to provide patients with significant improvements in quality of life, and to reduce the future economic burden on health-care systems. Because the approval of CNS drugs with novel mechanisms of action has been rare in recent years, there is the need to ameliorate the drug discovery processes in this field. Focusing on treatments that target disease pathophysiology will improve the chances of developing therapies that go beyond current symptomatic therapies. According to this scenario novel cellular and/or animal models of cognitive disorders should be enriched with novel risk factors and developed in combination with microfluidic-based technologies in order to improve significantly drug discovery processes in this field.

In the last several years a large number of studies have demonstrated common pathophysiological events in the onset of memory deficits both in depression and AD, including neuroinflammation with an impairment of TGF-Beta1 signaling. TGF-Beta1 is an anti-inflammatory cytokine that exerts a key role in recognition memory formation, where it promotes the transition from early to late Long Term Potentiation (LTP). Hence, a deficit of TGF-beta1 signaling can contribute to inflammaging and cognitive decline both in depression and AD. In this scenario our group will assess whether prenatal stress (PNS) during pregnancy in rats can induce in adolescence (PND35) a depressive phenotype with memory deficits. We will also evaluate whether the rescue of TGF-Beta1 signaling by antidepressants such as fluoxetine, in this animal model, might represent a new pharmacological approach for the treatment of cognitive symptoms in depression.

We will also search for new drugs or natural compounds or new formulations able to stimulate the release of TGF-Beta1 in vitro and then in vivo in animal models of cognitive disorders. Cell cycle activation is an early event in the pathogenesis of AD. In cultured rodent neurons, synthetic Beta-amyloid reproduces the neuronal cell cycle re-entry observed in the AD brain, and blockade of the cycle prevents Abeta-induced neurodegeneration. DNA polymerase-beta, which is induced by Abeta, is responsible for the DNA replication process that ultimately leads to neuronal death, but the molecular mechanism(s) linking DNA replication to neuronal apoptosis are presently unknown. We will therefore examine the molecular links between DNA replication and death in beta-amyloid-treated neurons (Claspin, Chk-1, caspase-7). To date, no data concerning the modulation

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

of Pin1 expression and activity and its role in the early stage of AD, which is critical to define whether and how an imbalance in Pin1 activity and/or expression may impact on neuronal homeostasis, are available. We will analyze Pin 1 expression both in experimental models of Abeta-induced neurodegeneration as well as in PBMC from mild AD patients.

Type-II diabetes is a recognized risk factor for AD and it has been hypothesized that hyperinsulinemia, saturating Insulin Degrading Enzyme (IDE), delay Abeta degradation thus promoting cognitive decline in SD. Our research group will assess whether carnosine, an endogenous peptide endowed with neuroprotective activity, can activate IDE thus promoting Abeta degradation.

Different studies, including also the ones conducted from our group, demonstrate that mediterranean diet and in particular polyphenols can prevent age-related cognitive decline. Therefore we will examine the molecular determinants underlying the neuroprotective activity of polyphenols, including their effects on TGF-beta1 signaling, with the aim to understand the therapeutic potential of these natural compounds against cognitive decline in AD.

Hypothesis and Significance: According to the pathology to drug approach currently adopted in drug discovery, analysis of the pathophysiology of cognitive deficits in neuropsychiatric disorders represents the first step for the identification of novel disease pathways and the validation of new pharmacological targets. Understanding of these disease pathways can lead to the selection of novel drug targets and the parallel development of disease-relevant models for subsequent drug discovery processes and the development of new psychotropic drugs. Recent studies suggest that neuroinflammation plays a key role in the pathophysiology of cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders and it represents a novel target for the treatment. Along this line our project this proposal at exploiting the hypothesis that TGF- β 1 signaling can represent a novel pharmacological target for the treatment of cognitive deficits in different clinical phenotypes of depression including also PNS-induced depression in adolescence. We also hypothesize that caspase can represent the molecular link between cell cycle activation and neuronal death in AD. In this scenario our hypothesis is that an imbalance in Pin1 activity and/or expression may represent an early event participating to the pathological alterations, leading to synaptic loss in AD. Finally we hypothesize that carnosine, by activating IDE, can represent a novel pharmacological tool able to promote Abeta clearance and prevent Abeta-induced neurodegeneration.

Specific Aims: The main objective of this research line is to start from the identification of new pharmacological targets in experimental models of neurodegenerative diseases to yield the identification of new biomarkers of cognitive decline in order to develop new diagnostic and therapeutic approaches.

Specific aims of this project are:

- 1) to analyze the pathogenetic mechanisms underlying cognitive deficits in preclinical models of neuropsychiatric disorders and develop novel neuroprotective strategies;
- 2) to validate the role of TGF-Beta1 as a new pharmacological target in cognitive disorders associated with PNS-induced depression and examine whether second-generation antidepressant drugs (FLX) can revert both affective and cognitive symptoms in PNS-related depression by rescue of TGF-Beta1 signaling;
- 4) To demonstrate that caspase represents the molecular link between cell cycle activation and neuronal death in AD;
- 5) To unravel Pin1 role as key point at the intersection of apoptotic and survival pathways in AD;
- 6) To demonstrate that carnosine activates IDE and prevents Abeta-induced neurodegeneration;
- 7) To identify the molecular determinants underlying the neuroprotective activity of polyphenols
- 8) To identify new early biomarkers of cognitive deterioration in AD.

Expected outcomes: The translational approach adopted in this research line will consist in the parallel analysis of the same pharmacological targets both in preclinical models of neuropsychiatric disorders and patients affected by cognitive disorders. We expect to: 1) identify new drug targets in preclinical models of cognitive disorders also with the implementation of microfluidics; 2) demonstrate the key role of TGF-Beta1 signaling in preclinical models of PNS-induced depression and demonstrate that fluoxetine can revert both affective and cognitive symptoms in an experimental model of PNS-related depression by rescue of TGF-Beta1 signaling; 3) demonstrate the key role of cell activation (pol-Beta, caspase and PIN1) in ABeta-induced neurodegeneration and identify the molecular links between cell cycle activation and neuronal death in Abeta-related neurodegeneration; 4) to demonstrate a reduction in Pin1 expression or an impairment of Pin1-related signaling pathways in human PBMCs from AD patients compared to controls; 5) to demonstrate that carnosine activates IDE and prevents Abeta-induced neurodegeneration; 6) to understand the therapeutic potential of polyphenols against cognitive decline in AD; 7) to validate the role of TGF-Beta1 as a new pharmacological target and an early biomarker of cognitive impairment in preclinical AD.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Significance and Innovation: Current approved drug treatments for cognitive disorders provide symptomatic relief, but do not affect the progression of neuropsychiatric diseases such as depression and AD. The innovation of this project consists in the identification of novel pharmacological targets (TGF-beta1 signaling, Claspin, Pin1, IDE) for the treatment of cognitive deficits in different neuropsychiatric disorders from depression to AD. The innovative approach adopted in this project will also be essential to identify new drugs/natural compounds and or new formulations (FLX+ natural compounds) able to stimulate the release of TGF-Beta1 in vitro and then in vivo in animal models of cognitive disorders. Finally, starting from the evidence on the benefits of polyphenols against cognitive decline in humans, we might develop new formulations including these natural compounds in combination with FLX to boost TGF-Beta1 release in vivo and then improve the treatment of cognitive deficits in neuropsychiatric disorders.

Translational relevance: Cognitive disorders treatment is only symptomatic and of limited impact in the progression of these diseases. There are no disease-modifying drugs available to halt the progressive neurodegeneration or to rescue cognitive deficits. The failures in AD therapy strongly suggest the importance of reconsidering the research strategies analyzing other mechanisms that may take place in AD as well as, in general, in other neuropsychiatric disorders such as depression which act as strong risk factor for AD. The present project will bring benefit in this framework improving secondary prevention strategies in cognitive disorders. In this context TGF-Beta1 signaling, Claspin, Pin1, IDE, might represent novel pharmacological targets for the treatment of cognitive deficits in neuropsychiatric disorders associated with cognitive deficits. In particular, when considering the role of TGF-Beta1 signaling in the pathophysiology of cognitive decline, we think that systemic treatment with second-generation antidepressants able to rescue TGF-Beta1 levels might become a new pharmacological approach to prevent neurodegeneration and rescue cognitive deficits both in depression and AD.

02 : Dolore e memoria: studio di nuovi bersagli molecolari per la terapia del dolore cronico e impatto su apprendimento e memoria

Responsabile: Chiechio Santina

Programma:

Parole chiave: dolore cronico; memoria; peptidi; recettori oppioidi; formalin test; legatura del nervo sciatico; novel object recognition

Altri enti coinvolti: Lo studio si terrà in collaborazione con il dipartimento di Scienze del Farmaco e della Salute dell'università degli studi di Catania

Anno inizio: 2022

Durata: 24

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Terapeutica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Pathophysiological Basis of Mental Disorders and Addictions - PMDA

Descrizione: Per l'esecuzione degli esperimenti verranno utilizzati topi maschi CD1 di 6-8 settimane. Come test di dolore infiammatorio verrà utilizzato il formalin test. Come modello di dolore neuropatico verrà utilizzato il CCI (Chronic constriction injury). Il formalin test consiste nell'iniezione di una soluzione diluita di formalina (10 microlitri, 5%) nella zampa posteriore destra del topo. L'iniezione di formalina causa una risposta bifasica caratterizzata da una fase iniziale (Fase I) che dura 5-10 minuti caratterizzata da leccamento, scuotimento della zampa iniettata, seguita da una fase di latenza e poi da una fase di dolore persistente, infiammatorio (Fase II) che dura fino a 60 minuti caratterizzata da meccanismi di sensibilizzazione centrale delle vie del dolore. In seguito all'iniezione di formalina, l'animale viene riposto in una gabbia di osservazione e il comportamento monitorato a blocchi di 5 minuti per un'ora. Tale metodologia sperimentale permette lo studio di diverse componenti del dolore e di testare farmaci attivi sulla componente nocicettiva (fase I) o sulla componente di dolore infiammatorio, persistente (Fase II). Il CCI, è un validato modello di dolore neuropatico che consiste nella legatura unilaterale del nervo sciatico. tale procedura determina la comparsa dei segni caratteristici del dolore neuropatico quali, l'iperalgia, l'allodinia e il dolore spontaneo. Per la misurazione dell'iperalgia l'animale verrà sottoposto ad uno stimolo termico (hargraves) la latenza in secondi verrà

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

paragonata ad un gruppo controllo senza legatura (sham operated). L'allodinia meccanica verrà misurata mediante un apposito set di filamenti calibrati che eserciteranno una pressione crescente espressa in grammi a livello plantare. Anche in questo caso la latenza in grammi verrà paragonata ad un gruppo sham operated.

Per studiare l'effetto sulla memoria verrà utilizzato il Novel Object Recognition test (NOR)

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Le ricerche condotte sono state incentrate sullo studio di bersagli molecolari utili nella terapia del dolore cronico.

Il dolore cronico sia di tipo infiammatorio che neuropatico ha un impatto significativo sulle funzioni cognitive del paziente e spesso può essere associato a disturbi dell'umore quale ansia e depressione oltre che declino cognitivo.

Durante l'ultimo anno sono stati valutati bersagli molecolari utili nella terapia del dolore cronico come i recettori oppioidi Mu, Delta (1) e Sigma-1 (2) studiando sia i meccanismi molecolari che sottendono lo sviluppo del dolore cronico che potenziali nuove entità molecolari come potenziali analgesici (1,2).

Dai risultati ottenuti valutando gli effetti di un agonista oppioidi duale Mu/Delta è stato evidenziato un effetto di riduzione dell'attivazione gliale in modelli di dolore neuropatico mediata dalla connessina 43 (1). Si è inoltre osservata una riduzione dei livelli di citochine come TNF e IL-6 (1).

Dallo studio di nuovi ligandi Sigma-1 si abbiamo osservato un potenziamento degli effetti analgesici oppioidi di alcuni derivati della N-normetazocina nel modello di dolore infiammatorio (formalin test) nel topo, suggerendo l'impiego di questi derivati come una strategia utile a potenziare gli effetti di analgesici oppioidi e al contempo ridurre gli effetti avversi (2).

Infine, sono attualmente in atto studi su meccanismi di dolore in modelli murini di Alzheimer insieme e alla valutazione di nuove molecole utili nei processi cognitivi e nella terapia del dolore.

Lavori pubblicati - Anno 2022

1- Vicario N, Denaro S, Turnaturi R, Longhitano L, Spitale FM, Spoto S, Marrazzo A, Zappalà A, Tibullo D, Li Volti G, Chiechio S, Pasquinucci L, Parenti R, Parenti C. Mu and Delta Opioid Receptor Targeting Reduces Connexin 43-Based Heterocellular Coupling during Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci.* 2022 May 24;23(11):5864. doi: 10.3390/ijms23115864. PMID: 35682543; PMCID: PMC9180638.

2- Turnaturi R, Chiechio S, Pasquinucci L, Spoto S, Costanzo G, Dichiaro M, Piana S, Grasso M, Amata E, Marrazzo A, Parenti C. Novel N-normetazocine Derivatives with Opioid Agonist/Sigma-1 Receptor Antagonist Profile as Potential Analgesics in Inflammatory Pain. *Molecules.* 2022 Aug 12;27(16):5135. doi: 10.3390/molecules27165135. PMID: 36014375; PMCID: PMC9413390.

Attività previste Attività 2023:

Sono attualmente in atto studi su meccanismi di dolore in modelli murini di Alzheimer insieme e alla valutazione di nuove molecole utili nei processi cognitivi e nella terapia del dolore.

A tal proposito verranno condotti studi comportamentali nel topo mediante il Novel Object Recognition (NOR) per la valutazione degli effetti procognitivi ed il formalin test per la valutazione degli effetti sul dolore persistente.

Background:

Chronic pain is considered a major international health problem affecting 3% of the general population (Barsky et al., 2001, Lohman et al., 2010) and it frequently coexists with many psychiatric and neurological conditions including depression, anxiety and cognitive impairment (Moriarty et al., 2011, Liu and Chen, 2014, Li, 2015). In chronic pain states, such as inflammatory and neuropathic pain, mechanisms of peripheral and central sensitization are responsible for the development and maintenance of pain hypersensitivity (Latremoliere and Woolf, 2009, Mannion and Woolf, 2000). In these conditions, most classical analgesic drugs such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) or opioids, lack adequate efficacy so that a number of adjuvants often need to be co-administered in order to obtain satisfactory pain relief (Gilron et al., 2013, Nekovarova et al., 2014).

It should also be emphasized that new drugs active against chronic pain, studied in small rodents, can have negative effects on memory and learning tests.

A new strategy investigated in collaboration with the Department of Drug and Health Sciences of the University of Catania is the study of a novel strategy in chronic pain through the development of MOPr/delta opioid peptide receptor (DOPr) dual-target compounds able to activate MOPr as well as DOPr (Martinez-Navarro et al., 2019). The MOPr/DOPr simultaneous targeting is supported by the co-expression of both receptors in areas involved in pain modulation and by the crucial role of MOPr activation in the regulation of DOPr trafficking (Scherrer et al., 2009). Moreover, activation of DOPr leads to fewer typical opioid side effects.

The objective of this research is therefore the study of new molecular targets useful for the development of drugs for the therapy of chronic pain.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Furthermore, the effects on memory and learning will be studied by using the NOR test (Novel Object Recognition).
Barsky AJ, Peekna HM, Borus JF. Somatic symptom reporting in women and men. *J Gen Intern Med.* 2001 Apr;16(4):266-75. doi: 10.1046/j.1525-1497.2001.00229.x.
Gilon I, Jensen TS, Dickenson AH. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. *Lancet Neurol.* 2013 Nov;12(11):1084-95. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70193-5.
Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain.* 2009 Sep;10(9):895-926. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.
Li JX. Pain and depression comorbidity: a preclinical perspective. *Behav Brain Res.* 2015 Jan 1;276:92-8. doi: 10.1016/j.bbr.2014.04.042.
Liu MG, Chen J. Preclinical research on pain comorbidity with affective disorders and cognitive deficits: Challenges and perspectives. *Prog Neurobiol.* 2014 May;116:13-32. doi: 10.1016/j.pneurobio.2014.01.003.
Lohman D, Schleifer R, Amon JJ. Access to pain treatment as a human right. *BMC Med.* 2010 Jan 20;8:8. doi: 10.1186/1741-7015-8-8.
Mannion RJ, Woolf CJ. Pain mechanisms and management: a central perspective. *Clin J Pain.* 2000 Sep;16(3 Suppl):S144-56. doi: 10.1097/00002508-200009001-00006.
Martínez-Navarro M, Maldonado R, Baños JE. Why mu-opioid agonists have less analgesic efficacy in neuropathic pain? *Eur J Pain.* 2019 Mar;23(3):435-454. doi: 10.1002/ejp.1328.
Moriarty O, McGuire BE, Finn DP. The effect of pain on cognitive function: a review of clinical and preclinical research. *Prog Neurobiol.* 2011 Mar;93(3):385-404. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.002.
Nekovarova T, Yamamotova A, Vales K, Stuchlik A, Fricova J, Rokyta R. Common mechanisms of pain and depression: are antidepressants also analgesics? *Front Behav Neurosci.* 2014 Mar 25;8:99. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00099.
Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell.* 2009 Jun 12;137(6):1148-59. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.019.

Hypothesis and Significance: This project is the follow-up of previous studies which are summarized in the publications listed below and the behavioral effects of new MOR / DOR ligands on two forms of persistent pain such as inflammatory pain and neuropathic pain will be evaluated.
The effect of these new molecules on memory tests will also be evaluated in order to exclude any memory impairments elicited to the analgesic drug tested.
Fidilio A, Grasso M, Turnaturi R, Caruso G, Spitale FM, Vicario N, Parenti R, Spoto S, Musso N, Marrazzo A, Chiechio S, Caraci F, Pasquinucci L, Parenti C. The Multimodal MOPr/DOPr Agonist LP2 Reduces Allodynia in Chronic Constriction Injured Rats by Rescue of TGF- β 1 Signalling. *Front Pharmacol.* 2021 Oct 6;12:749365. doi: 10.3389/fphar.2021.749365. PMID: 34690781; PMCID: PMC8526862.
Vicario N, Turnaturi R, Spitale FM, Torrisi F, Zappalà A, Gulino R, Pasquinucci L, Chiechio S, Parenti C, Parenti R. Intercellular communication and ion channels in neuropathic pain chronicization. *Inflamm Res.* 2020 Sep;69(9):841-850. doi: 10.1007/s00011-020-01363-9. Epub 2020 Jun 12. PMID: 32533221.
Turnaturi R, Chiechio S, Salerno L, Rescifina A, Pittalà V, Cantarella G, Tomarchio E, Parenti C, Pasquinucci L. Progress in the development of more effective and safer analgesics for pain management. *Eur J Med Chem.* 2019 Dec 1;183:111701. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111701. Epub 2019 Sep 16. PMID: 31550662.
Seggio M, Contino A, Maccarrone G, Parenti C, Merlo S, Pappalardo G, Giuffrida A, Chiechio S. Preclinical evidence of enhanced analgesic activity of duloxetine complexed with succinyl- β -cyclodextrin: A comparative study with cyclodextrin complexes. *Int J Pharm.* 2019 Jul 20;566:391-399. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.05.077. Epub 2019 May 31. PMID: 31158453.
Vicario N, Pasquinucci L, Spitale FM, Chiechio S, Turnaturi R, Caraci F, Tibullo D, Avola R, Gulino R, Parenti R, Parenti C. Simultaneous Activation of Mu and Delta Opioid Receptors Reduces Allodynia and Astrocytic Connexin 43 in an Animal Model of Neuropathic Pain. *Mol Neurobiol.* 2019 Nov;56(11):7338-7354. doi: 10.1007/s12035-019-1607-1. Epub 2019 Apr 28. PMID: 31030416.
Pasquinucci L, Turnaturi R, Calò G, Pappalardo F, Ferrari F, Russo G, Arena E, Montenegro L, Chiechio S, Prezzavento O, Parenti C. (2S)-N-2-methoxy-2-phenylethyl-6,7-benzomorphan compound (2S-LP2): Discovery of a biased mu/delta opioid receptor agonist. *Eur J Med Chem.* 2019 Apr 15;168:189-198. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.02.043. Epub 2019 Feb 18. PMID: 30822708.
Pasquinucci L, Turnaturi R, Montenegro L, Caraci F, Chiechio S, Parenti C. Simultaneous targeting of MOR/DOR: A useful strategy for inflammatory pain modulation. *Eur J Pharmacol.* 2019 Mar 15;847:97-102. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.01.031. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30690004.
Zammataro M, Merlo S, Barresi M, Parenti C, Hu H, Sortino MA, Chiechio S. Chronic Treatment with Fluoxetine Induces Sex-Dependent Analgesic Effects and Modulates HDAC2 and mGlu2 Expression in Female Mice.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Front Pharmacol. 2017 Oct 20;8:743. doi: 10.3389/fphar.2017.00743. PMID: 29104538; PMCID: PMC5654865.
Vicario N, Parenti R, Arico' G, Turnaturi R, Scoto GM, Chiechio S, Parenti C. Repeated activation of delta opioid receptors counteracts nerve injury-induced TNF- α up-regulation in the sciatic nerve of rats with neuropathic pain: A possible correlation with delta opioid receptors-mediated antiallostatic effect. Mol Pain. 2016 Sep 2;12:1744806916667949. doi: 10.1177/1744806916667949. PMID: 27590071; PMCID: PMC5024981.

Specific Aims: The behavioral effects of new MOR / DOR ligands on two forms of persistent pain such as inflammatory pain and neuropathic pain will be evaluated.
The effect of these new molecules on memory tests will also be evaluated.
Male CD1 mice aged 6-8 weeks will be used to carry out the experiments.
The formalin test will be used as an inflammatory pain test (Chiechio et al., 2009). CCI will be used as a model of neuropathic pain (Chiechio et al., 2002). The formalin test consists of injecting a dilute solution of formalin (10 microliters, 5%) into the right hind paw of the mouse. The formalin injection causes a biphasic response characterized by an initial phase (Phase I) lasting 5-10 minutes characterized by licking, shaking of the injected paw, followed by a phase of latency and then by a phase of persistent, inflammatory pain (Phase II) lasting up to 60 minutes characterized by central sensitization mechanisms of the pain pathways. The CCI is a validated model of neuropathic pain which consists of the unilateral ligation of the sciatic nerve. This procedure determines the appearance of the characteristic signs of neuropathic pain such as hyperalgesia, allodynia, and spontaneous pain. For the measurement of hyperalgesia, the animal will be subjected to a thermal stimulus (Hargraves) the latency in seconds will be compared to a control group without ligation (sham-operated). Mechanical allodynia will be measured by means of a special set of calibrated filaments that will exert an increasing pressure expressed in grams at the plantar level. Also in this case the latency in grams will be compared to a sham-operated group. The Novel Object Recognition test (NOR) will be used to study the effect on memory. This test has been extensively validated in the literature (Antunes and Biala, 2012). The experimental protocol used in this study involves two-phase experimentation: 1-habituation and 2-test, carried out on two consecutive days, respectively. In phase 1-habituation (day 1), the animal is placed in an arena specially formulated for this study for a period of 10 minutes the day before the test is performed in order to minimize stress during the behavioral assessment. In phase 2-test (day 2) the animal is placed in the arena inside which two identical objects have been placed equidistant from the walls for 10 minutes. The animal is then placed in its cage for three hours. After this time, the animal will be placed in the arena where one of the objects will be replaced with a new one. The animal's behavior will be videotaped for 10 minutes. For the evaluation of the test, a researcher will measure, blindly, the contact time with the new object compared to the old one and will calculate the discrimination index (DI).
Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cogn Process. 2012 May;13(2):93-110. doi: 10.1007/s10339-011-0430-z.
Chiechio S, Zammataro M, Morales ME, Busceti CL, Drago F, Gereau RW 4th, Copani A, Nicoletti F. Epigenetic modulation of mGlu2 receptors by histone deacetylase inhibitors in the treatment of inflammatory pain. Mol Pharmacol. 2009 May;75(5):1014-20. doi: 10.1124/mol.108.054346. Epub 2009 Mar 2. PMID: 19255242.
Chiechio S, Caricasole A, Barletta E, Storto M, Catania MV, Copani A, Vertechy M, Nicolai R, Calvani M, Melchiorri D, Nicoletti F. L-Acetylcarnitine induces analgesia by selectively up-regulating mGlu2 metabotropic glutamate receptors. Mol Pharmacol. 2002 May;61(5):989-96. doi: 10.1124/mol.61.5.989. PMID: 11961116.

Expected outcomes: The present study will select potential new drug candidates for the treatment of chronic pain.

Significance and Innovation: The significance of this project is to address the challenge in achieving adequate pain control in chronic pain by the study of new molecular targets combined with the evaluation of non-pain symptoms of psychiatric or neurological disorders often associated with chronic pain.

Translational relevance: Chronic pain is a severe and debilitating condition with a very high impact on the general population. Thus, future therapeutic strategies for pain control may involve a new pharmacological approach targeting MOR/DOR receptors and possibly evaluating other psychiatric comorbidities often associated with chronic pain or derived by analgesic drug's side effects.

03 : TGF-beta1 come un nuovo biomarcatore plasmatico per la predizione del declino cognitivo in pazienti con Sindrome di Down

Responsabile: Grasso Margherita

Programma:

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Parole chiave: sindrome di down; biomarcatori periferici; demenza, tgf-beta1.

Altri enti coinvolti: Dipartimento di Scienze del Farmaco e della Salute, Università degli Studi di Catania

Anno inizio: 2022

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Clinical Neuroscience and Neurodegeneration - CNN

Descrizione: L'obiettivo principale di questo progetto è validare il ruolo del TGF- β 1 come nuovo biomarcatore periferico in grado di predire il tasso di declino cognitivo nei pazienti con DS.

Lo scopo di questo progetto è studiare le alterazioni delle citochine pro- e antinfiammatorie, con particolare attenzione alla via del TGF- β 1, nel plasma e nelle cellule mononucleate del sangue periferico (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) ottenute da pazienti con DS e rispettivi controlli sani di pari sesso ed età. I campioni di plasma utilizzati per eseguire il test ELISA vengono raccolti secondo procedure standard e le PBMC saranno isolate dal sangue intero di DS giovani (19-35 anni) e adulti (>35 anni) senza e con AD e controlli sani di età e sesso corrispondenti reclutati presso l'Oasi Research Institute - IRCCS (Troina, Italia) secondo il protocollo di Nagy et al. [1], con leggeri modifiche.

L'RNA totale sarà estratto dalle PBMC e le citochine pro-infiammatorie (es. IL-6, TNF-beta, IL-1 β) e i livelli di mRNA del TGF- β 1 saranno quantificati mediante real-time PCR. Il contenuto proteico degli stessi marcatori sarà quantificato mediante analisi Western Blot.

Verrà effettuata l'analisi dell'associazione dei biomarcatori sopra descritti con le misurazioni cognitive al basale (T0), a 12-15 mesi (T1) e a 24 mesi (T2).

Referenze:

1- Nagy, Z., et al., Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 2002. 317(2): p. 81-4.

Risultati e prodotti conseguiti: Risultati 2022:

Per validare l'ipotesi che un deficit del TGF- β 1 possa verificarsi a livello periferico in una fase preclinica di malattia di Alzheimer (AD) in soggetti con Sindrome di Down (DS), anche prima dell'inizio del declino cognitivo, abbiamo misurato i livelli plasmatici di questa citochina antinfiammatoria in soggetti con DS con o senza AD. Mediante saggio ELISA, abbiamo trovato che nonostante i livelli plasmatici di TGF- β 1 fossero ridotti negli individui con DS-AD (35-60 anni, n=9) rispetto al gruppo controllo, le differenze non erano statisticamente significative, mentre un'ulteriore e significativa diminuzione è stata osservata nei livelli plasmatici di TGF- β 1 al momento della valutazione neuropsicologica iniziale (T0) sia nei soggetti adulti con DS senza AD (35-60 anni, n=14) sia nei giovani soggetti con DS (19-35 anni, n=26) rispetto ai gruppi controllo di pari età e sesso. Nella nostra coorte, abbiamo trovato una significativa riduzione dei livelli plasmatici di TGF- β 1 nelle giovani femmine DS (19-35 anni) rispetto al gruppo controllo di pari età e sesso. Inoltre, abbiamo osservato un deficit dei livelli plasmatici di TGF- β 1, anche se non statisticamente significativo, nei soggetti adulti sia maschi che femmine con DS (35-60 anni) senza una manifestazione clinica di AD. È interessante notare che in individui con DS, il deficit plasmatico di TGF- β 1 a T0 è positivamente correlato con il tasso di declino cognitivo a T1 (12 mesi) valutato dal punteggio ottenuto al Test of Severe Impairment (TSI) e calcolato come Δ TSI (dTSI: $TSI_{T1} - TSI_{T0} / 12$ mesi). Inoltre, abbiamo trovato un aumento dei livelli plasmatici del TNF-alfa, una nota citochina pro-infiammatoria coinvolta nel processo infiammatorio dell'AD, nei soggetti con DS con o senza AD alla valutazione neuropsicologica iniziale. Infine, dal punto di vista neuropsicologico, i soggetti con DS e demenza a T0 presentano punteggi al TSI più bassi rispetto ai soggetti DS della stessa fascia di età ma senza AD e ai soggetti DS più giovani (19-35 anni). A T0, DS giovani (19-35 anni) e anziani (35-60 anni, con o senza manifestazione clinica di AD) mostrano un simile QI, mentre abbiamo riscontrato una differenza significativa tra soggetti DS anziani e soggetti più giovani nel punteggio medio ottenuto al TSI a T0, suggerendo quindi nel primo gruppo una maggiore compromissione cognitiva. Inoltre, abbiamo trovato una correlazione inversa tra età e punteggio medio al TSI alla valutazione neuropsicologica iniziale.

Infine, dati preliminari ottenuti nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) dimostrano che i livelli di TGF- β 1 sono ridotti nel medium delle PBMCs di 6 soggetti DS senza demenza a T0, cioè prima del trattamento con fluoxetina 1 μ M, un antidepressivo di seconda generazione dotato di attività neuroprotettiva mediante il rilascio di TGF- β 1, rispetto ai livelli misurati nel medium delle PBMCs ottenute da controlli sani di pari età e sesso. Il TGF- β 1 è ridotto sia nel plasma che nelle

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

PBMCs degli stessi soggetti con DS e, cosa interessante, abbiamo scoperto che il trattamento con fluoxetina per 24 ore è stato in grado di ripristinare i livelli di TGF- β 1 nel medium delle PBMCs dei soggetti con DS con valori paragonabili ai controlli.

Questi risultati sono stati presentati al VI Convegno Nazionale SINDROME DI DOWN: dalla Ricerca alla Terapia, 21/22 ottobre 2022.

Attività previste Attività 2023:

Per valutare il tasso di declino cognitivo, il Test of Severe Impairment (TSI) verrà somministrato anche al periodo di follow-up a 24 mesi (T2) in modo da seguire la progressione dell'AD in questo sottogruppo di soggetti ad alto rischio di sviluppare demenza. L'analisi di altri marcatori pro-infiammatori (tra cui IL-1 β , IL-6 e IL-18) sarà effettuata nel plasma di soggetti sia giovani che adulti con DS e di controlli di pari età e sesso mediante saggio ELISA. Inoltre, verranno effettuate analisi statistiche per correlare i livelli plasmatici di TGF- β 1 ai livelli di una o più citochine pro-infiammatorie, al fine di validare il ruolo del TGF- β 1 come nuovo biomarcatore periferico in grado di predire il tasso di declino cognitivo nei pazienti con DS. L'analisi dei livelli di mRNA del TGF- β 1 e di citochine pro-infiammatorie (es. IL-1 β , IL-6, TNF-alfa) sarà effettuata nelle PBMCs mediante real-time PCR. Il contenuto proteico degli stessi marcatori sarà quantificato mediante analisi Western Blot. Infine aumenteremo il numero di soggetti con DS reclutati fino a 12 per confermare i dati preliminari ottenuti nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) e verificare se il trattamento con fluoxetina 1 μ M, per 24 ore riesca a ripristinare i livelli di TGF- β 1 nel medium delle PBMCs dei soggetti con DS con valori paragonabili ai controlli.

Background: Down syndrome (DS) represents one of the most common genetic disorders caused when abnormal cell division results in extra genetic material from chromosome 21 affecting more than 5 million people worldwide [2]. The central nervous system (CNS) is particularly affected in DS patients showing an increased risk of cognitive decline and dementia, in particular DS subjects are at remarkably increased risk of Alzheimer's Disease (AD) development, which is associated with mortality in 70% of DS older than 35 years [3]. The prevalence of dementia increases exponentially, affecting more than 55% of DS patients aged 40-49 and 90% of adults older than 60 years of age [4, 5], even if several reports underestimated these percentages [6] suggesting that these contrasting results can be due to cohort effects paralleled to the difficulties to dementia diagnosis due to the pre-existent intellectual disability in DS subjects [7]. In this context, it is of critical importance to find new approaches that comprehensively assess health status and cognitive function, allowing to follow the dementia and AD progression in DS patients. It has been proposed that a deficit of neurotrophic factors such as Transforming factor Beta 1 (TGF- β 1) has an essential role in the pathogenesis of AD [8] and therefore could be considered the hypothesis that a deficit of this neurotrophin may represent a novel biomarker able to predict the rate of cognitive decline in DS patients [9]. In this scenario, blood-based biomarkers offer the advantage of being very accessible, less expensive and better tolerated than neuroimaging and cerebrospinal fluid (CSF) biomarker approaches because blood samples are easier to obtain and non-invasive. Moreover, these biomarkers could have relevance for diagnosis and precision medicine for AD in DS patients.

References:

2. Carmona-Iragui, M., et al., Diagnostic and prognostic performance and longitudinal changes in plasma neurofilament light chain concentrations in adults with Down syndrome: a cohort study. *The Lancet Neurology*, 2021. 20(8): p. 605-614.
3. Hithersay, R., et al., Association of Dementia With Mortality Among Adults With Down Syndrome Older Than 35 Years. *JAMA Neurol*, 2019. 76(2): p. 152-160.
4. Ballard, C., et al., Dementia in Down's syndrome. *Lancet Neurol*, 2016. 15(6): p. 622-36.
5. Fortea, J., et al., Alzheimer's disease associated with Down syndrome: a genetic form of dementia. *The Lancet Neurology*, 2021. 20(11): p. 930-942.
6. Coppus, A., et al., Dementia and mortality in persons with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res*, 2006. 50(Pt 10): p. 768-77.
7. Zigman, W.B., Atypical aging in Down syndrome. *Dev Disabil Res Rev*, 2013. 18(1): p. 51-67.
8. Caraci, F., et al., Neurobiological links between depression and AD: The role of TGF- β 1 signaling as a new pharmacological target. *Pharmacol Res*, 2018. 130: p. 374-384.
9. Caraci, F., et al., Searching for new pharmacological targets for the treatment of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Eur J Pharmacol*, 2017. 817: p. 7-19.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Hypothesis and Significance: The aim of this project is to characterize TGF- β 1 as a new blood-based biomarker of AD in DS by analyzing a longitudinally cohort of young and adult DS patients comparing the results obtained with healthy age- and sex-matched controls.

During the last years, inflammatory markers have been shown more consistently to be altered in both DS and AD in DS patients [10] and an impairment of TGF- β 1 signaling pathway has been demonstrated to be specific to the AD brain and, particularly, to the early phase of the disease [11]. We hypothesize that the combination of a set of circulating biomarkers, with particular focus on TGF- β 1 pathway and pro-inflammatory cytokines, could improve the ability to decompose heterogeneity across age-related cognitive decline and AD progression in DS patients.

In this context, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) could reflect, in the periphery, biological alterations found in the CNS and could represent a useful tool for the identification of new biomarkers for the diagnostic and/or therapeutic approach of AD in DS patients [12].

References:

10. Petersen, M.E. and S.E. O'Bryant, Blood-based biomarkers for Down syndrome and Alzheimer's disease: A systematic review. *Dev Neurobiol*, 2019. 79(7): p. 699-710.
11. Caraci, F., et al., Dysfunction of TGF- β 1 signaling in Alzheimer's disease: perspectives for neuroprotection. *Cell Tissue Res*, 2012. 347(1): p. 291-301.
12. Esteras, N., et al., Lymphocytes in Alzheimer's disease pathology: Altered signaling pathways. *Curr Alzheimer Res*, 2016. 13(4): p. 439-49.

Specific Aims: The main goal of this project is to validate the role of TGF- β 1 as a new peripheral biomarker able to predict the rate of cognitive decline in DS patients by analyzing a longitudinally assessed cohort of adult (>35 years) DS without and with AD, young (19-35 years) DS without dementia and of healthy age- and sex-matched controls (CTRL). A written informed consent was obtained from the patients (or their families) recruited at Oasi Research Institute - IRCCS (Troina, Italy) and the same will apply to for new patients. AD diagnosis will be performed following neurological examination using ICD-10 criteria [13]. DS patients with AD are categorized in Early Onset, Middle Stage, and Late dementia according to the Dementia Scale for Down syndrome (DSDS). To assess cognitive decline, the Test of Severe Impairment (TSI) was administered at baseline (T0) (range 0-24, lower scores indicate greater impairment) and at the follow-up period (at 12-15 months (T1) and at 24 months (T2)) will be administered in order to follow AD onset and/or progression in this high-risk population.

Analysis of pro-inflammatory markers (including IL-1 β , IL-6, TNF- γ , IFN- γ) and anti-inflammatory proteins with particular focus on TGF- β 1 will be carried out in plasma of young and adult DS patients and of healthy age- and sex-matched controls. Additionally, analysis of mRNA levels of anti- (TGF- β 1 and IL-10) and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- γ , IFN- γ) in PBMCs will be quantified by real time PCR. The protein content of the same markers will be quantified by Western Blot analysis.

A second cohort of 20 DS patients, will be recruited for a long-term (24 - 48 months) prospective longitudinal study at Oasi research Institute in order to confirm our preliminary results about baseline TGF- β 1 plasma levels and in order to validate the role of peripheral TGF- β 1 as a novel biomarker able to predict the rate of cognitive decline in DS patients.

References:

13. Aylward, E.H., et al., Diagnosis of dementia in individuals with intellectual disability. *Journal of Intellectual Disability Research*, 1997. 41(2): p. 152-164.

Expected outcomes: We expect a deficit of TGF- β 1 or an impairment of TGF- β 1 signaling paralleled by an exacerbated pro-inflammatory cytokines production in plasma and/or PBMCs from DS patients could represent a useful peripheral tool to follow AD onset and/or progression in this high-risk population as well as to predict the rate of cognitive decline of dementia in DS patients.

Significance and Innovation: Recent studies suggested that DS patients with or without AD differ for a set of plasma proteins related to inflammation and neurodegeneration [14]. In this scenario, there is the need to combine neuropsychological clinical evaluation with peripheral biomarkers for the diagnosis of AD and the monitoring of AD progression in DS patients [15] and this project will permit to follow AD onset and/or progression in DS patients by the recruitment of a longitudinally assessed cohort of DS patients without and with dementia by administration of TSI and by analyzing TGF- β 1 levels at baseline and at the follow-up period.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

In this context, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) could represent a useful tool for the identification of new peripheral biomarkers for the diagnosis of AD in DS patients. Indeed, we will characterize the inflammatory profile of plasma and of PBMCs obtained from young and adult DS without AD and from adult DS subjects with AD clinical manifestations, with particular focus on TGF- β 1 levels. This comprehensive set of measurements will be analysed to identify peripheral changes that could anticipate cognitive decline in DS, with the final aim of defining biomarkers of the preclinical phase of AD in DS.

References:

14. Iulita, M.F., et al., An inflammatory and trophic disconnect biomarker profile revealed in Down syndrome plasma: Relation to cognitive decline and longitudinal evaluation. *Alzheimers Dement*, 2016. 12(11): p. 1132-1148.
15. Hartley, D., et al., Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals. *Alzheimers Dement*, 2015. 11(6): p. 700-9.

Translational relevance: The diagnosis of AD in DS individuals is challenging due to the underlying intellectual disability and cognitive decline associated with aging of these subjects. For this reason, the identification of novel biomarkers could have a significant clinical impact for the management of AD pathology in DS patients. Then, the combination of biological and neuropsychological markers will increase the diagnostic accuracy of dementia in DS subjects. Furthermore, the results obtained in this project could represent an essential step to improve drug discovery processes of AD in DS and to establish which patients should be included in future secondary prevention trials to study potential disease-modifying drugs able to rescue TGF- β 1 levels. Finally, the information acquired in this study could highlight the potential blood-based biomarkers for use in detecting dementia and AD among this at risk population.

04 : Sviluppo e validazione di nuovi tool diagnostici basati sulla microfluidica per la diagnosi precoce della malattia di Alzheimer

Responsabile: Caruso Giuseppe

Programma:

Parole chiave: microfluidica; biomarcatori periferici; diagnosi precoce; malattia di Alzheimer; microglia/monociti/macrofagi.

Altri enti coinvolti: "Dr. Massimo Camarda, STLab s.r.l., Via Anapo 53, 95126 Catania, Italy.

Prof. Susan M. Lunte, Ralph N. Adams Institute for Bioanalytical Chemistry, University of Kansas, Lawrence, KS 66047-1620, USA; Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Kansas, Lawrence, KS 66047-1620, USA; Department of Chemistry, University of Kansas, Lawrence, KS 66047-1620, USA."

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Terapeutica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Clinical Neuroscience and Neurodegeneration - CNN

Descrizione: L'obiettivo principale è di applicare ed implementare una metodica innovativa microfluidica basata sull'elettroforesi su microchip accoppiata a fluorescenza indotta da laser (o in alternativa a detezione elettrochimica) per la rilevazione e la quantificazione di biomarcatori. L'applicazione di tale metodologia permetterà di migliorare e velocizzare non solo l'identificazione e la validazione di nuovi target farmacologici, ma anche una più efficiente valutazione e predizione dell'AD. L'utilizzo di microchip in PDMS di diverse geometrie verrà accoppiato, tramite elettrodi, ad un alimentatore ad alta tensione modulabile che permetterà l'iniezione e la separazione dei biomarcatori derivatizzati all'interno del campione biologico. Il rilevamento della fluorescenza verrà effettuato utilizzando un microscopio invertito con laser a 488 nm (laser a diodi) per l'eccitazione del campione ed un fotomoltiplicatore per il rilevamento.

Come parte del progetto verranno svolte le seguenti attività:

- 1) messa a punto del dispositivo;
- 2) ottimizzazione delle condizioni di separazione e rilevamento;

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

- 3) reclutamento pazienti e raccolta campioni;
- 4) studi di validazione in modelli in vitro di AD per supportare l'efficacia del dispositivo microfluidico;
- 5) isolamento di plasma e PBMC da campioni di sangue ottenuti da soggetti sani e AD in uno stato iniziale di malattia;
- 6) studi di validazione su plasma e PBMC;
- 7) applicazione del dispositivo microfluidico validato per la rilevazione simultanea di diversi biomarcatori legati alla neuroinfiammazione, allo stress ossidativo, alla segnalazione delle neurotrofine e al metabolismo energetico.

Ad oggi, gli studi clinici sui trattamenti per l'AD hanno prodotto risultati deludenti. Una possibile ragione di questo fallimento è che le terapie vengono generalmente somministrate dopo l'esordio clinico della malattia, una fase in cui potrebbe essere troppo tardi bloccare e/o invertire il danno generato dagli eventi patogeni. La diagnosi e la diagnosi precoci dell'AD sono quindi della massima importanza per la gestione della malattia, tuttavia, le procedure attuali nella diagnosi dell'AD sono invasive, costose e richiedono un'importante collaborazione da parte del paziente. Inoltre, troppo spesso i trattamenti non sono disponibili in quanto potrebbero essere scoperti da assicurazione o di difficile accesso, o entrambi. Pertanto, vi è una grande necessità di sviluppare metodi economici, rapidi, accurati e non invasivi per la diagnosi di AD. Una volta sviluppato e ottimizzato, i membri del Sistema Sanitario Nazionale, quali medici e clinici, potranno utilizzare il dispositivo ottenendo il duplice vantaggio di monitorare l'insorgenza e la progressione della malattia nonché la valutazione delle risposte ad un determinato trattamento farmacologico.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

L'obiettivo principale dell'anno 2022 è stato quello di mettere a punto una metodica microfluidica innovativa basata sull'elettroforesi su microchip accoppiata a fluorescenza indotta da laser per la rilevazione e la quantificazione di biomarcatori. In particolare, attraverso l'applicazione di tale metodica, sono stati ottenuti dei dati molto interessanti sulla produzione di specie reattive da parte di cellule microgliali umane sottoposte a diversi protocolli pro-infiammatori che mimano condizioni patologiche quali depressione e morbo di Alzheimer. L'utilizzo di microchip in PDMS di diverse geometrie è stato accoppiato, tramite elettrodi, ad un alimentatore ad alta tensione modulabile che ha permesso l'iniezione e l'analisi dei campioni biologici. Il rilevamento della fluorescenza è stato effettuato utilizzando un microscopio invertito con laser a 488 nm (laser a diodi) per l'eccitazione del campione ed un fotomoltiplicatore per il rilevamento. Questa metodica innovativa ha inoltre permesso l'implementazione dei processi di drug discovery, consentendo di valutare il potenziale terapeutico di diverse molecole tra le quali la carnosina. Il manoscritto contenente i dati sperimentali sopra menzionati, accoppiati a dati di HPLC relativi allo studio del metabolismo energetico, è attualmente under review su Front. in Pharmacology (Q1 ζ IF: 5.98).

Durante il primo anno, come parte del progetto, sono quindi state svolte le seguenti attività: 1) messa a punto del dispositivo; 2) ottimizzazione delle condizioni di separazione e rilevamento; 3) studi di validazione in modelli in vitro di AD per supportare l'efficacia del dispositivo microfluidico.

Attraverso diverse collaborazioni internazionali, stiamo inoltre lavorando alla sintesi e validazione di nuove formulazioni con elevato potenziale terapeutico che verranno poi testate attraverso la metodica basata su microfluidica.

Di seguito sono elencate le pubblicazioni scientifiche relative al presente progetto di ricerca:

- 1) Development of an Icarin-Loaded Bilosome-Melittin Formulation with Improved Anticancer Activity against Cancerous Pancreatic Cells
- 2) Colon Targeted Eudragit Coated Beads Loaded with Optimized Fluvastatin-Scorpion Venom Conjugate as a Potential Approach for Colon Cancer Therapy: In Vitro Anticancer Activity and In Vivo Colon Imaging
- 3) Surface-tailoring of emulsomes for boosting brain delivery of vinpocetine via intranasal route: in vitro optimization and in vivo pharmacokinetic assessment
- 4) The Therapeutic Potential of Carnosine as an Antidote against Drug-Induced Cardiotoxicity and Neurotoxicity: Focus on Nrf2 Pathway
- 5) Unveiling the Hidden Therapeutic Potential of Carnosine, a Molecule with a Multimodal Mechanism of Action: A Position Paper

Attività previste Attività 2023:

Come parte del progetto, durante il secondo anno, verranno svolte le seguenti attività:

- 1) valutati gli effetti su vitalità cellulare, morfologia ed espressione di geni relativi ad infiammazione e stress ossidativo di buffer di separazione con differente composizione;
- 2) testato il potenziale terapeutico della carnosina, sia in modelli in vitro che in modelli in vivo;
- 3) reclutamento pazienti e raccolta campioni (isolamento di plasma e PBMC da campioni di sangue ottenuti da soggetti sani e

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

patologici);

4) messa a punto di un sistema basato su microdialisi per il monitoraggio in vivo dei livelli di neurotrasmettitori in un modello di depressione.

Background: "Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, it has a progressive course, spanning across three decades, and covers a continuum of preclinical, prodromal and clinical stages. Alterations in otherwise normal brain proteins amyloid- β (A β) and tau, and their pathological aggregation into plaques and tangles, respectively, are defining hallmark features of AD in the brain, with buildup of tau tangles correlating closely with cognitive decline (www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures). Furthermore, as recently shown, plasma metabolites related to cellular energy metabolism are altered in adults with AD [PMID: 31419370], representing additional AD biomarkers that do not directly involve amyloid and/or tau pathology. To date, clinical trials of treatments for AD have yielded disappointing results. One possible reason for this failure is that therapies are generally given after clinical disease onset, a stage at which it might be too late to block and/or reverse the damage generated by the pathogenic events. Early detection and diagnosis of AD is of utmost importance for disease management, however, current procedures in AD diagnosis are invasive, expensive and require mutual corroboration [PMID: 16549412]. Moreover, far too often they are unavailable because they may be uncovered by insurance or difficult to access, or both. Thus, there is great necessity to develop inexpensive, rapid, accurate, and non-invasive methods for AD diagnosis. Presently, a promising blood-based biomarker to detect A β aggregates deposition is represented by the A β 42/A β 40 ratio, whereas tau aggregation can be detected by using phosphorylated tau (p-tau) at threonine 181 and 217 [PMID: 23850333]. Moreover, the anti-inflammatory cytokine transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) [PMID: 29438781] and the neurofilament light protein (NFL), a scaffolding cytoskeleton protein released upon neuronal damage considered predictive of AD [PMID: 33470669; 30902060], also appear to play a significant role in cognitive decline both in Mild Cognitive Impairment (MCI) and AD, and are readily detectable in plasma specimens. Microfluidic devices offer many advantages for the analysis of the content of single or multiple cells compared to standard methods (e.g., flow cytometry, cell imaging, liquid chromatography, and CE). Representative applications include the simulation of cellular responses that mimic the in vivo environment, such as relaxed or constricted blood vessels, the ability to grow and manipulate a single or group of cells within a specific compartment of the chip, and the possibility to integrate on-line sample preparation and subsequent analysis [PMIDs: 24010877; 26159570; 21513343; 21967743]. Furthermore, this technology allows for the study of complex systems by reproducing the realistic micro-anatomy and activities, mechanics, and physiological response of specific organs (organs- and organoids-on-a-chip), therefore allowing the shift from flat two-dimensional (2D) cell-based systems to more complex and sensible three-dimensional (3D) architectures [PMIDs: 30818801; 28615311]. Microfluidic-chip-based systems have extensively been used in small volume sample preparation, separation, mixing, purification, detection, and assay, and could represent a suitable platform in AD biomarker detection and analysis [PMID: 32549277]."

Hypothesis and Significance: "The causes for the pathological alterations detected in the post-mortem AD brain are not known conclusively but are likely to be multifactorial in nature, which has certainly had a negative impact upon the understanding of its etiology, also complicating both drug development and biomarker discovery. In this respect, the search for biomarkers to aid accurate diagnosis, predict progression and for use in clinical trials has become a major research goal, however, current procedures in AD diagnosis are invasive, expensive and require mutual corroboration. Many laboratories have tested the hypothesis that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) can provide a window into the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as AD, either because a subset of them, e.g., specific T cells or monocytes, traffic into the brain and thus may directly participate in disease mechanisms or because an inherited or acquired trait shared between PBMCs and brain cells might serve as a biomarker of neuroinflammation and oxidative stress. We hypothesize that PBMCs and plasma biomarkers could reflect, in the periphery, biological alterations found in the central nervous system and can be used as an experimental model to identify the biochemical and molecular signatures of AD. As a part of our hypothesis, A β accumulation sustains a pro-inflammatory process and a deficit in anti-inflammatory cytokines (especially TGF- β 1) in periphery and their combined measurement can predict the rate of cognitive decline and the risk to develop AD."

Specific Aims: "The overall goal of this project is to employ microfluidic-based approaches to characterize and validate a series of blood-based biomarkers of AD pathology. The innovative technologies of microfluidics will be applied both in an experimental in vitro model of AD and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and plasma obtained from patients in an initial state of disease. Microfluidics will allow the simultaneous validation of different pharmacological targets related to the processes of neuroinflammation, oxidative stress and neurotrophin signaling. These targets will then be used to predict, in the same models,

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

the possible efficacy of neuroprotective drugs."

Expected outcomes: "At the end of the project an innovative and ultra-sensitive microfluidic device able to simultaneously detect different peripheral biomarkers in plasma and/or PBMCs will be obtained."

Significance and Innovation: "AD develops slowly and gets worse over time resulting in an irreversible and severe loss of intellectual abilities, reason why the early diagnosis of AD, possibly through non-invasive analysis methods such as those detecting peripheral biomarkers, is of utmost importance for disease management. Multimorbidity is also common in AD; in fact, depression, cerebrovascular disease, osteoporosis, and diabetes mellitus are associated with incident AD. The identification of AD at an early stage will therefore also help to prevent/slow down other pathologies. The innovation potential lies in three aspects: the first innovation involves the measurement of different blood-based biomarkers through a microfluidic device to predict AD; the second innovation refers to the combination of the biomarkers considered, coupling classical biomarkers at central nervous system level (e.g., A β , tau) to AD biomarkers that do not directly involve amyloid or tau pathology (energy metabolism); the third innovation is represented by the development of microfluidic devices, allowing for the implementation of the existent technologies."

Translational relevance: "AD is the sixth leading cause of death in the United States (US) and the fifth leading cause among those over age 65. The current number of those with AD dementia is 6.2 million and this is anticipated to grow to 12.7 million in 2050 if effective interventions are not found. Approximately 910,000 people age 65 or older developed AD in US in 2011, a number that would be expected to be even higher in 2021. The percentage of people with AD increases dramatically with age: 5.3% of people age 65 to 74, 13.8% of people age 75 to 84 and 34.6% of people age 85 or older have AD. In 2021, the total national cost of caring for people living with AD and other dementias is projected to reach \$355 billion. The diagnosis of AD affects not only the patient but the entire family and their supporting caregivers. The impact of the diagnosis on caregivers is multifaceted, ranging from economic concerns to concerns about having to alter their lifestyle to care for the patient. Direct-care workers that provide most of the long-term care to older adults living at home or in residential settings are represented by nurse aides, home health aides, and personal and home care aides. In nursing homes, nursing assistants make up the majority of staff who work with cognitively impaired residents. Additional professional profiles that have to deal with AD include physicians (especially geriatricians), physician assistants, nurse practitioners, and pharmacists. Once developed and optimized, members of National Health System such as physicians and clinicians will be able to use the innovative device obtaining the double advantage of monitoring the onset and the progression of the disease as well as the evaluation of pharmacologic responses to drug treatment. The system will also give the chance to obtain a sensitive detection method making it possible to rapidly analyze microliter-volume samples in a continuous manner, providing physicians and clinicians with near real-time data. Additionally, the possible miniaturization of the device could allow to switch from a benchtop system to a portable detection system to be positioned close to the patients to monitor the variation of biomarkers in real time."

05 : Ruolo dei recettori nicotinici e dopaminergici durante l'invecchiamento e nella Malattia di Alzheimer

Responsabile: PUZZO DANIELA

Programma:

Parole chiave: Malattia di Alzheimer; Recettori nicotinici; Recettori dopaminergici; Peptide beta-amiloide; Memoria; Plasticità sinaptica; modelli animali

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Terapeutica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Clinical Neuroscience and Neurodegeneration - CNN

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Descrizione: Nel presente progetto saranno effettuati esperimenti sia in vitro che in vivo utilizzando tecniche di elettrofisiologia, comportamento, biochimica e imaging per comprendere il ruolo della trasmissione colinergica e dopaminergica durante l'invecchiamento e l'AD e le loro interazioni con gli oligomeri di Abeta e tau nei fenomeni di plasticità sinaptica e memoria ippocampale. Saranno utilizzati diversi modelli animali: topi wild type (WT) C57Bl/6J; topi APP KO; topi alpha7 KO; topi 3xTg; topi D3-KO. Gli animali saranno bilanciati per sesso e utilizzati a diverse età in relazione ai risultati degli studi precedenti. Ogni condizione sarà confrontata con il relativo controllo.

Gli animali saranno trattati con farmaci agonisti/antagonisti dei recettori oggetto di interesse e con inibitori/stimolatori delle cascate enzimatiche dei nucleotidi ciclici.

Saranno effettuati:

- esperimenti di elettrofisiologia su fettine di ippocampo in vitro per valutare la trasmissione e la plasticità sinaptica a breve e lungo termine;
- studi comportamentali sui diversi modelli animali per valutare il ruolo di alpha7-nAChRs e D3-Rs in diversi tipi di memoria;
- esperimenti per valutare le variazioni di espressione delle molecole correlate alla plasticità (es. BDNF, pCamKII, pCREB) nelle diverse condizioni tramite WB;
- esperimenti per valutare i livelli di oligomeri di Abeta e tau tramite ELISA e WB, o le forme di deposito tramite Congo Red e Bielschowsky silver stain nelle diverse condizioni

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti: Durante l'anno 2022, in collaborazione con gruppi di ricerca nazionali e internazionali, abbiamo dimostrato che: i) i nucleotidi ciclici cAMP e cGMP convertono la memoria a breve termine in memoria a lungo termine soltanto se è assicurata sia la produzione che la funzione del peptide beta-amiloide. Infatti, la delezione genetica di APP o dei recettori alpha7 nicotinici previene l'effetto pro-cognitivo degli inibitori delle fosfodiesterasi 4 e 5; ii) l'inibizione dei recettori dopaminergici D3 ripristina la plasticità sinaptica e la memoria in modelli murini di invecchiamento.

In parallelo, sono stati svolti altri studi mirati a migliorare le metodiche utilizzate per effettuare i test comportamentali (Tropea et al., JAD, 2022) e a illustrare come produrre cannule guida ippocampali con l'ausilio della tecnologia di stampa 3D (Tropea et al., eNeuro, 2022).

Di seguito i prodotti della ricerca per l'anno 2022:

Pubblicazioni scientifiche:

1. Tropea MR, Gulisano W, Vacanti V, Arancio O, Puzzo D*, Palmeri A. Nitric oxide/cGMP/CREB pathway and amyloid-beta crosstalk: From physiology to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2022 Nov 20;193(Pt 2):657-668. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.11.022.
2. Tropea MR, Torrisi A, Vacanti V, Pizzone D, Puzzo D*, Gulisano W. Application of 3D Printing Technology to Produce Hippocampal Customized Guide Cannulas. *eNeuro.* 2022 Sep 13;ENEURO.0099-22.2022. doi: 10.1523/ENEURO.0099-22.2022.
3. Tropea MR, Sanfilippo G, Giannino F, Davi V, Gulisano W, Puzzo D. Innate Preferences Affect Results of Object Recognition Task in Wild Type and Alzheimer's Disease Mouse Models. *J Alzheimers Dis.* 2022;85(3):1343-1356. doi: 10.3233/JAD-215209.

Abstract a congressi:

1. Tropea MR, Melone M, Vacanti V, Centaro A, Gulisano W, Leggio GM, Conti F, Puzzo D. Inhibition of D3 receptors rescues synaptic dysfunction and memory impairment in aged and Alzheimer's disease mouse models. In: *Neuroscience 2022, San Diego (CA), USA, 12-16 Nov 2022 (Nanosymposium)*. Comunicazione orale
2. Tropea MR, Melone M, Vacanti V, Centaro A, Gulisano W, Leggio GM, Conti F, Puzzo D. Physiological role of dopamine D3 receptors in hippocampal synaptic plasticity and memory in physiological conditions and age-related disorders. In: *72nd SIF National Congress, Bari, Italy, 14-16 Sept 2022 (Symposium)*. Comunicazione orale
3. Tropea MR, Gulisano W, Romano A, Giannino F, Vacanti V, Leggio GM, Puzzo D. Physiological role of dopamine D3 receptors in hippocampal synaptic plasticity and memory. In: *The 39th Congress of International Union of Physiological Sciences, Beijing, China (Online) 7-11 May 2022*. Comunicazione orale
4. Tropea MR, Melone M, Vacanti V, Gulisano W, Leggio GM, Conti F, Puzzo D. Inhibition of dopamine d3 receptors improves hippocampal synaptic plasticity and memory. In: *FENS Forum 2022, Paris, France, 9-13 July 2022*. Poster

Attività previste

Si prevede di continuare la sperimentazione effettuando ulteriori esperimenti sia in vitro che in vivo utilizzando tecniche di elettrofisiologia, comportamento, biochimica e imaging per comprendere il ruolo della trasmissione colinergica e dopaminergica durante l'invecchiamento e l'AD e le loro interazioni con gli oligomeri di Abeta e tau nei fenomeni di plasticità sinaptica e

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

memoria ippocampale. Saranno utilizzati diversi modelli animali: topi wild type (WT) C57Bl/6J; topi APP KO; topi alpha7 KO; topi 3xTg; topi D3-KO. Gli animali saranno bilanciati per sesso e utilizzati a diverse età in relazione ai risultati degli studi precedenti. Ogni condizione sarà confrontata con il relativo controllo.

Gli animali saranno trattati con farmaci agonisti/antagonisti dei recettori oggetto di interesse e con inibitori/stimolatori delle cascate enzimatiche dei nucleotidi ciclici.

Saranno effettuati:

- esperimenti di elettrofisiologia su fettine di ippocampo in vitro per valutare la trasmissione e la plasticità sinaptica a breve e lungo termine;
- studi comportamentali sui diversi modelli animali per valutare il ruolo di alpha7-nAChRs e D3-Rs in diversi tipi di memoria;
- esperimenti per valutare le variazioni di espressione delle molecole correlate alla plasticità (es. BDNF, pCamKII, pCREB) nelle diverse condizioni tramite WB;
- esperimenti per valutare i livelli di oligomeri di Abeta e tau tramite ELISA e WB, o le forme di deposito tramite Congo Red e Bielschowsky silver stain nelle diverse condizioni

Background: Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of cognitive functions leading to dementia occurring in the elderly (Prince et al., 2015). Basic, pre-clinical and clinical research studies have suggested that beta-amyloid peptide (Abeta) and hyperphosphorylated tau protein play a major role in the pathogenesis of the disease. Indeed, patients present typical brain lesions represented by senile plaques and neurofibrillary tangles, due to deposits of the insoluble forms of Abeta and tau proteins (Hardy and Selkoe, 2002). However, both proteins can form soluble aggregates (Lasagna-Reeves et al., 2010; Nisbet et al., 2015) which, in the form of oligomers, appear to be responsible for the initial damage of synaptic function (Selkoe, 2002; Fa et al., 2016) and therefore of memory. These oligomers have been found in the brains and CSF of AD patients (Haass and Selkoe, 2007; Berger et al., 2007; Brunden et al., 2008) and increase during aging (Maeda et al., 2006; Puzzo et al., 2014). However, therapeutic approaches aimed at decreasing Abeta or tau levels have not produced the expected results in AD patients (Gulisano et al., 2018). This is probably due to the poor knowledge of Abeta or tau interaction, their role at the synapse and the crosstalk with the main neurotransmitters involved in memory formation such as the cholinergic and the dopaminergic system.

As for the cholinergic system, several studies have shown the loss of cholinergic neurons in the basal forebrain and the progressive degeneration of the cholinergic projections to the hippocampus and neocortex in AD patients (Parri et al., 2011). The importance of cholinergic transmission is confirmed by the fact that cholinesterase inhibitors, drugs that block the degradation of acetylcholine in the synaptic cleft, are among the few approved drugs used to improve symptoms in AD patients, even if they fail to block disease progression. For several years our laboratory has been studying the interactions between Abeta, tau and the cholinergic system, with particular reference to the alpha7-nAChRs receptors, highly expressed in the hippocampus and involved in cognitive processes and in the pathophysiology of AD (Parri et al., 2011). Our studies, partly carried out in previous ζ CR ζ projects, have allowed to clarify various aspects regarding the interaction between Abeta and tau (Puzzo et al., 2020), the role of the interaction between Abeta and alpha7-nAChRs in physiological conditions (Gulisano et al., 2019) and in the onset of AD (Tropea et al., 2021).

Regarding the dopaminergic system, dopamine has been widely shown to play a role in memory (Kulisevsky, 2002). Even if previous studies have mainly focused on Parkinson's disease, caused by a degeneration of dopaminergic neurons, it has been recently shown that alterations of dopaminergic transmission might play a role in the pathogenesis of AD (Nobili et al., 2016). Here, we will focus on D3-Rs that have been demonstrated to play a role in cognition (Nakajima et al., 2013) and whose inhibition improves learning in animal models (Laszy et al., 2005). Furthermore, D3-R polymorphism influence symptoms in the early phase of AD (Sato et al., 2009). However, the mechanisms underlying D3-Rs involvement in memory formation during aging and in AD are unknown.

Previous studies have shown that the cholinergic system interacts with the dopaminergic system. In particular, the stimulation of alpha7-nAChRs prevents the neurodegeneration of dopaminergic neurons through the activation of astrocytes and microglia (Liu et al., 2012) and dopamine modulates the cholinergic cortical excitability in patients with AD (Martorana et al., 2009). Furthermore, an interaction between nAChRs and D3 has recently been demonstrated in neuroplasticity and neuroprotection (Bono et al., 2020).

Hypothesis and Significance: AD is the most common neurodegenerative disorder, but current therapies have limited efficacy. An impairment of processes involved in synaptic strengthening is likely to constitute an early event in the disease that eventually leads to severe cognitive deficits. The progressive increase in Abeta levels is thought to be the main etiopathogenetic event. However, other actors are involved in the disease and are likely to play a major role in AD. Among these, based on previous studies, we will focus on the interactions among Abeta and tau protein with alpha7-nAChRs and D3-Rs. In particular, we have previously demonstrated that Abeta exerts its

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

physiological function through alpha7-nAChRs (Gulisano et al. 2019) and that a genetic deletion of alpha7-nAChRs induces an increase of Abeta levels and several features of an AD-like pathology in animal models (Tropea et al., 2021). On the other hand, our preliminary results have suggested that D3-Rs inhibition improves synaptic plasticity and memory in animal models. Based on these findings, we will study the role of nicotinic and dopaminergic transmission and their interaction in hippocampal synaptic plasticity and memory in physiological conditions, during aging and in AD. We believe that this study might give novel insights to better understand AD pathophysiology and, consequently, to identify novel therapeutic targets.

Specific Aims: Based on the state of the art, the general aim of this project is to investigate the interaction between Abeta, tau, alpha7-nAChRs and D3-Rs at the synapse in physiological conditions, during aging and in AD. To this end, we will perform both in vitro and in vivo experiments by using electrophysiology, behavioral studies, biochemistry and imaging techniques. Different animal models will be used: wild type (WT) C57Bl/6J mice; APP KO mice; alpha7 KO mice; 3xTg mice; D3-KO mice. In particular, we will evaluate:

- 1) how the interactions between Abeta and tau oligomers and alpha7-nAChRs modify synaptic transmission and plasticity and memory in physiological conditions, during aging and AD;
- 2) how the interactions between Abeta and tau oligomers and D3-Rs modify synaptic transmission and plasticity and memory in physiological conditions, during aging and AD;

To evaluate the interactions between Abeta and tau and D3-Rs oligomers in synaptic transmission and plasticity and memory in physiological conditions, during aging and AD;

- 3) the mechanisms underlying Abeta- and tau-induced modifications of synapses, with particular reference to intracellular mediators (cyclic nucleotides) and plasticity-related proteins and the possible contribution of alpha7-nAChRs and D3-Rs.

Expected outcomes: We expect:

- i) to clarify how Abeta and tau oligomers interact to impair synaptic plasticity and memory;
- ii) to understand the role of cholinergic and dopaminergic systems at the hippocampal synapse in physiological conditions, during aging and AD;
- iii) to identify the contribution of alpha7-nAChRs and D3-Rs in both physiological and pathological conditions, focusing on their effect on Abeta- and tau-induced cognitive dysfunction;
- iv) to understand how modulation of alpha7-nAChRs and D3-Rs affect intracellular pathway and plasticity-related molecules;
- v) to provide with pre-clinical data on the potential use of drugs modulating alpha7-nAChRs and D3-Rs as therapeutics in aging and AD.

Significance and Innovation: The increase of Abeta and tau has been recognized as a major player in AD pathophysiology. However, most of the therapeutic approaches aimed to decrease Abeta levels have been a failure so far, whereas studies on tau recently have growth but clinical trials are not encouraging, begging the question of whether this strategy is correct. In parallel, several studies have focused on cholinergic dysfunction in AD. Nevertheless, cholinesterase inhibitors such as donepezil, rivastigmine or galantamine aimed at increasing cholinergic efficiency, do not induce a long-term improvement in cognition. Similarly, clinical trials with agonists of nicotinic cholinergic receptors (nAChRs) improved cognition in AD patients, but the slight beneficial effect was limited in time. On the other hand, some studies have focused on the involvement of dopaminergic system, but little is known especially regarding D3-Rs whose inhibition might be beneficial against AD. The main novelty of our project is the focus on the interplay among these two systems that are known to be involved in the cascade of events underlying synaptic deficits and memory loss during aging and AD. In particular, we will try to unravel the mechanisms underlying the early synaptic modifications to identify novel therapeutic approaches targeting nAChRs and/or D3-Rs.

Translational relevance: AD, the most common form of dementia affecting the elderly, has lately gained increasing attention for its growing prevalence that is expected to exponentially increase in the next few years. Besides representing a serious health and social problem, the disease causes exorbitant costs for the healthcare system and to find effective therapeutic interventions has become a priority. Although several efforts have been put trying to counteract the disease, no therapies are available so far to prevent AD onset and progression. Results from this project might contribute to shed light into the pathophysiology of the disease and be useful to find novel therapies to counteract AD onset and progression. Furthermore, our focus on aging might be of interest to better understand similarities and differences between age-dependent or AD-induced cognitive decline. Given the perspective epidemic trait of AD in the next years, we feel that this proposal might have a high translational relevance.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

06 : Ripristino della via del TGF- β 1 come nuova strategia farmacologica e di neuroprotezione nella malattia di Alzheimer

Responsabile: Giambirtone Maria Concetta

Programma:

Parole chiave: Malattia di Alzheimer, TGF- β 1, depressione, disturbo cognitivo lieve

Altri enti coinvolti: Dipartimento di Scienze del Farmaco e della Salute, Università degli Studi di Catania

Anno inizio: 2022

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Genes, Genomes and Genetics

Project Classification SS: Molecular Genetics - MGA

Descrizione: L'obiettivo principale di questo progetto è quello di analizzare se il genotipo +10 CC del gene del TGF- β 1 modifica i livelli di trascrizione o riduce il rilascio di TGF- β 1 nei linfociti dei pazienti MCI/AD. I linfociti saranno preparati da campioni di sangue intero secondo il protocollo originario Nagy et al. [1] con alcune modifiche. Il DNA sarà isolato dai linfociti e i pazienti con MCI e AD saranno genotipizzati per gli SNPs del TGF- β 1 +10 (T/C) e +25 (G/C). L'RNA totale sarà estratto dai linfociti e i livelli di mRNA del TGF- β 1 saranno quantificati mediante real-time PCR mentre i livelli proteici di TGF- β 1 saranno esaminati mediante Western Blot o ELISA. La valutazione della funzione cognitiva globale sarà effettuata nei pazienti con AD utilizzando il mini-mental state examination (MMSE) e il Milan-overall-dementia assessment (MODA) [2], mentre nei pazienti con MCI amnesico l'MMSE sarà combinato con specifici strumenti neuropsicologici per la valutazione delle singole funzioni cognitive (memoria, attenzione, funzioni esecutive). Un tasso di progressione di 0-1,9 punti MMSE/anno sarà classificato come lento, un tasso di progressione di 2-4,9 punti MMSE/anno come intermedio, mentre un tasso di progressione di >5 punti MMSE/anno sarà classificato come veloce. I sintomi depressivi invece saranno valutati mediante la scala di Hamilton.

Referenze:

- 1- Nagy Z, Combrinck M, Budge M, McShane R. Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2002, 317:81-4.
- 2- Brazzelli M, Capitani E, Della Sala S, Spinnler H, Zuffi M. A neuropsychological instrument adding to the description of patients with suspected cortical dementia: the Milan overall dementia assessment. *J Neurol. Neurosurg Psychiatry.* 1994, 57:1510-7.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Per investigare il ruolo del TGF- β 1 come possibile biomarcatore periferico nella malattia di Alzheimer (AD), abbiamo eseguito una prima analisi preliminare mediante la misurazione dei livelli plasmatici di questa citochina anti-infiammatoria in soggetti con AD e in soggetti controllo di pari sesso ed età. La valutazione delle funzioni cognitive globali è stata effettuata nei pazienti con AD utilizzando il Mini-Mental State Examination (MMSE) secondo il quale un tasso di progressione tra 0-1,9 punti MMSE/anno è stato classificato come lento, un tasso di progressione di 2-4,9 punti MMSE/anno come intermedio, mentre un tasso di progressione di >5 punti al MMSE/anno è stato classificato come veloce.

Mediante saggio ELISA abbiamo trovato un aumento dei livelli plasmatici del TGF- β 1 nei soggetti AD (n=27) rispetto al gruppo controllo (n=16) al momento della valutazione neuropsicologica iniziale (T0). Anche se non statisticamente significativo, abbiamo trovato un aumento dei livelli plasmatici di TGF- β 1 sia nei soggetti maschi che nelle femmine AD rispetto ai gruppi controllo di pari età e sesso. Classificando i pazienti con AD in base al tasso di progressione della malattia, non sono state trovate differenze significative nei livelli plasmatici del TGF- β 1.

Inoltre, abbiamo trovato una correlazione negativa tra età dei pazienti con AD e punteggio medio ottenuto al MMSE alla valutazione neuropsicologica iniziale.

Infine, abbiamo trovato una correlazione negativa tra i livelli basali di TGF- β 1 a T0 e il tasso di deterioramento cognitivo e delle funzioni cognitive globali calcolato come deltaMMSE (dMMSE: MMSE T1 \pm MMSE T0 / 12 mesi).

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Attività previste Attività 2023:

Il numero dei soggetti con AD reclutati e dei controlli sani verranno aumentati in modo da confermare i dati preliminari ottenuti a livello plasmatico e inoltre verrà estratto il DNA genomico da sangue venoso periferico, mediante il Kit Nucleon Bacc3 della Amersham Pharmacia Biotech.

Verrà analizzato se il genotipo +10 CC del gene del TGF- β 1 modifica i livelli di trascrizione o riduce il rilascio di TGF- β 1 nei linfociti dei pazienti AD. Infine l'RNA totale verrà estratto dai linfociti dei pazienti AD e dei controlli sani e i livelli di mRNA del TGF- β 1 verranno quantificati mediante real-time PCR.

Background: Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly, affecting approximately 35 million people worldwide [1,2]. AD is mainly characterized by memory loss and impairments in language, comprehension, and spatial skills, and by the presence of neuropsychiatric symptoms, such as depression, agitation, and psychosis, which are common precipitants of institutional care [3]. Drugs that are currently used in the treatment of AD do not slow the progression of this disease. Neurotrophic factors can be promising potential targets to retard or halt the progression of neurodegeneration. Among neurotrophic factors, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) has been demonstrated to be involved in the pathophysiology of AD. TGF- β 1 exerts neuroprotective effects against β -amyloid (A β)-induced neurodegeneration and a deficit of TGF- β 1 signaling can contribute to inflammation and cognitive decline both in depression and AD [4]. Antidepressant drugs exert immune-regulatory effects, reducing the production of proinflammatory cytokines and stimulating the synthesis of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β 1 in depressed patients [5,6]. It has been recently identified a key role for TGF- β 1 in recognition memory formation demonstrating that this neurotrophic factor is essential for the transition from early to late long term potentiation [7]. TGF- β 1 protein levels are predominantly under genetic control, and the TGF- β 1 gene, located on chromosome 19q13.1 Δ 3, contains several single nucleotide polymorphisms (SNPs) upstream and in the transcript region which may affect protein levels [8-10]. SNPs at codons +10 (T/C) and +25 (G/C), that reduce TGF- β 1 expression, have been associated with an increased conversion from MCI into AD [11]. The TGF- β 1 +10 C/C functional polymorphism is associated with the occurrence of depression in AD patients [12]. The human +10 CC genotype of TGF- β 1 gene, which affects the levels of expression of TGF- β 1, increases the risk to develop Late-Onset AD (LOAD) and is also associated with depressive symptoms in AD (>5-fold risk) [12]. No studies have been conducted yet to analyze the potential relationship between the neuroprotective effects of fluoxetine and TGF- β 1 release in MCI/AD patients.

References:

- [1] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010, 362:329-44.
- [2] Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2011, 7:137-52.
- [3] Ballard C, Day S, Sharp S, Wing G, Sorensen S. Neuropsychiatric symptoms in dementia: importance and treatment considerations. *Int Rev Psychiatry.* 2008, 20:396-404.
- [4] Caraci F, Spampinato SF, Morgese MG, Tascetta F, Salluzzo MG, Giambirtone MC, Caruso G, Munafò A, Torrisi SA, Leggio GM, Trabace L, Nicoletti F, Drago F, Sortino MA, Copani A. Neurobiological links between depression and AD: The role of TGF- β 1 signaling as a new pharmacological target. *PharmacolRes.* 2018, 130:374-384.
- [5] Caraci F, Copani A, Nicoletti F, Drago F. Depression and Alzheimer's disease: neurobiological links and common pharmacological targets. *Eur J Pharmacol.* 2010, 626:64-71.
- [6] Maes M, Yirmiya R, Norberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, Kubera M, Bob P, Lerer B, Maj M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis.* 2009, 24:27-53.
- [7] Caraci F, Gulisano W, Guida A.C., Impellizzeri A.R., Drago F., Puzzo D. & Palmeri A. A key role for TGF- β 1 in hippocampal synaptic plasticity and memory. *Sci Rep.* 2015, 5:11252. [8] Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation.* 1998, 66:1014-20. [9] Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control o

Hypothesis and Significance: Depressive symptoms may be among the earliest symptoms of preclinical stages of AD and a long-term treatment with antidepressants is known to reduce the risk to develop AD [1,2]. Different second-generation antidepressants are currently studied for their neuroprotective properties in AD. It has recently demonstrated that fluoxetine is neuroprotective against A β -induced neurodegeneration via a paracrine signalling mediated by TGF- β 1 [3]. Additionally, fluoxetine is able to increase circulating TGF- β 1 levels in depressed patients and to reverse memory impairment in animal models of AD [4]. The main goal of this project is to examine if the +10 CC genotype of the TGF- β 1 gene reduces the transcription and/or release of TGF- β 1 from MCI/AD lymphocytes and increases the rate of cognitive decline and if fluoxetine prevents cognitive decline in depressed amnesic MCI patients.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

References:

[1] Kessing LV, Søndergård L, Forman JL, Andersen PK. Antidepressants and dementia. *J Affect Disord.* 2009, 117:24-9.

[2] Bartels C, Wagner M, Wolfsgruber S, Ehrenreich H, Schneider A; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Impact of SSRI Therapy on Risk of Conversion From Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Dementia in Individuals With Previous Depression. *Am J Psychiatry.* 2018, 175:232-241.

[3] Caraci F, Tascetta F, Merlo S, Benatti C, Spampinato SF, Munafo A, Leggio GM, Nicoletti F, Brunello N, Drago F, Sortino MA, Copani A. Fluoxetine Prevents A β (1-42)-Induced Toxicity via a Paracrine Signaling Mediated by Transforming-Growth-Factor- β 1. *Front Pharmacol.* 2016, 7:389.

[4] Wang J, Zhang Y, Xu H, Zhu S, Wang H, He J, Zhang H, Guo H, Kong J, Huang Q, Li XM. Fluoxetine improves behavioral performance by suppressing the production of soluble β -amyloid in APP/PS1 mice. *Curr Alzheimer Res.* 2014, 11:672-80.

Specific Aims: We will first examine TGF- β 1 mRNA levels in lymphocytes derived from AD patients with different genotypes of TGF- β 1 +10 (T/C) SNPs. We will analyze whether +10 CC genotype of the TGF- β 1 gene modifies TGF- β 1 transcription in AD lymphocytes. The SNP at codon +10 (T/C) is within the 29-amino acid signal sequence of TGF- β 1 gene and it might affect both the secretion and the conversion to active TGF- β 1 [14]. To this purpose we will use ELISA assays to measure plasma levels of active TGF- β 1 as well as the release of active TGF- β 1 in lymphocytes derived from AD patients with different genotypes of TGF- β 1 gene (CC, CT, TT) at baseline and after a specific stimulation with fluoxetine (100nM -1 μ M). We will then examine the correlation between TGF- β 1 genotypes and the rate of cognitive decline in MCI/AD patients. Next, we will examine in amnesic MCI patients, with or without depressive symptoms, whether the CC genotype of TGF- β 1 gene increases the risk to develop depressive disorders and the risk of conversion of MCI into AD. If antidepressant drugs as fluoxetine will demonstrate the ability to rescue TGF- β 1 levels in lymphocytes from MCI/AD patients, we expect that SSRIs can delay cognitive decline in depressed amnesic MCI patients with the CC genotype, finally reducing the risk of conversion into AD.

Expected outcomes: We assumed that fluoxetine can induce TGF- β 1 release in AD patients. We will also examine the influence of TGF- β 1 genotypes on the rate of cognitive decline in AD patients and the risk of conversion from MCI to AD. In the event that hypothesis of rescuing TGF- β 1 levels upon treatment with antidepressants will not be validated in MCI/AD patients, still this study will be useful to identify new biological markers able to predict the rate of cognitive decline in MCI/AD patients.

Significance and Innovation: Current approved drug treatments for AD provide symptomatic relief but do not affect the progression of the disease. The innovation of this project consists in the demonstration that the SSRI fluoxetine can exert a disease-modifying activity by rescue of TGF- β 1 signaling independently of its antidepressant activity. An impairment of TGF- β 1 signaling represents an early event in the pathogenesis of AD. For this reason, it is important to identify TGF- β 1 genotypes contributing to the deficit of the TGF- β 1 pathway. MCI/AD patients with a deficit of TGF- β 1 pathway identified in this project might be selected for future neuroprotective strategies with fluoxetine or other drugs able both to rescue TGF- β 1 signaling and prevent the progression of AD.

Translational relevance: Depressive symptoms may be among the earliest symptoms of preclinical stages of AD and targeting them therapeutically might delay transition to dementia. Since a deficit of TGF- β 1 signaling is able to promote both the neurodegenerative process in AD and the onset of depressive symptoms in AD, we propose that a deficit in TGF- β 1 genotypes might be useful biomarkers for predicting both the progression rate of AD and the conversion from MCI to AD. Finally, this project might be a first step to establish whether antidepressant drugs can exert in MCI patients a disease-modifying activity by a rescue of TGF- β 1 signaling.

07 : Nuove strategie per la diagnosi e per il trattamento farmacologico dei disturbi cognitivi nella Sindrome di Down

Responsabile: CARACI FILIPPO

Programma:

Parole chiave: risk factors, cognitive disorders, Down syndrome psychometric tools, biological markers, cognition.

Altri enti coinvolti: "Prof. Rafael De La Torre (IMIM, Barcellona, Spagna)."

Anno inizio: 2022

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Clinical Neuroscience and Neurodegeneration - CNN

Descrizione: Nel presente studio osservazionale prospettico multicentrico saranno reclutati 6 soggetti adulti con SD di età compresa tra i 18 ed i 35 aa di età, mentre i restanti 24 soggetti con SD saranno reclutati presso gli altri 4 centri coinvolti ovvero l'IMIM (Barcelona, Spagna), l'Institut Jérôme Lejeune (Parigi, Francia), il Centre Hospitalier Universitaire di Saint-Etienne (Francia) e l'Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, Spagna). Dopo aver dato il proprio consenso informato, i 6 soggetti adulti con Sindrome di Down saranno arruolati tra coloro che hanno già ricevuto una diagnosi e che sono attualmente seguiti per tale patologie presso l'IRCCS Associazione Oasi Maria SS in Troina. Il disegno dello studio prevede il reclutamento dei 6 soggetti con SD ed una valutazione al baseline delle funzioni cognitive tramite la NIH-TCB-ID ed il Bordeaux maze test con successiva rivalutazione a 4 settimane di distanza dalla prima visita con gli stessi strumenti psicometrici. Il presente studio osservazionale non comporta alcun rischio per i soggetti coinvolti e consentirà invece una più attenta e approfondita valutazione delle funzioni cognitive nei soggetti con SD, assai utile per successivi trattamenti farmacologici e non farmacologici finalizzati a migliorare la qualità di vita di tale classe dei pazienti. A tutti i partecipanti nello studio saranno prelevati dei campioni di sangue per gli esami di routine previsti dal ricovero ambulatoriale e dalla corrente pratica clinica e per lo studio dei livelli di endocannabinoidi nel plasma dei pazienti con DS al fine di identificare nuovi biomarcatori di deficit cognitivi.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Nel presente studio osservazionale prospettico multicentrico sono stati reclutati 6 soggetti adulti con SD di età compresa tra i 18 ed i 35 aa di età, mentre 6 soggetti con SD sono stati reclutati presso l'IMIM (Barcelona, Spagna) e gli altri 18 saranno reclutati presso l'Institut Jérôme Lejeune (Parigi, Francia), il Centre Hospitalier Universitaire di Saint-Etienne (Francia) e l'Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, Spagna) nel 2023.

Dopo aver dato il proprio consenso informato, i 6 soggetti adulti con Sindrome di Down sono stati arruolati dalla Dr.ssa Concetta Barone tra coloro che hanno già ricevuto una diagnosi e che sono attualmente seguiti per tale patologie presso l'IRCCS Associazione Oasi Maria SS in Troina.

Il disegno dello studio prevedeva il reclutamento dei 6 soggetti con SD ed una valutazione al baseline delle funzioni cognitive tramite la NIH-TCB-ID ed il Bordeaux maze test con successiva rivalutazione a 4 settimane di distanza dalla prima visita con gli stessi strumenti psicometrici eseguite dalla Dr.ssa Marilena Recupero. Il reclutamento e la valutazione si sono conclusi entro il 31-12-2 ed i dati inviati via iPad all'IMIM centro coordinatore di Barcellona (Dr.ssa Beatriz Fagundo).

Attività previsteAttività 2023:

Nel 2023 sarà completato il reclutamento dei 18 soggetti con DS presso l'Institut Jérôme Lejeune (Parigi, Francia), il Centre Hospitalier Universitaire di Saint-Etienne (Francia) e l'Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, Spagna) Il presente studio osservazionale consentirà una più attenta e approfondita valutazione delle funzioni cognitive nei soggetti con SD, assai utile per successivi trattamenti farmacologici e non farmacologici finalizzati a migliorare la qualità di vita di tale classe dei pazienti. A tutti i partecipanti nello studio saranno prelevati dei campioni di sangue per gli esami di routine previsti dal ricovero ambulatoriale e dalla corrente pratica clinica e per lo studio dei livelli di endocannabinoidi e TGFβ1 nel plasma dei pazienti con DS al fine di identificare nuovi biomarcatori di deficit cognitivi. Analizzeremo infine la correlazione tra i punteggi della NIH Toolbox Cognitive Battery in intellectual disability (NIHTB-CB per ID), composto da sette test neuropsicologici che analizzano diverse abilità cognitive e le prestazioni nel Bordeaux maze Test. Il punteggio composito della cognizione è stato appositamente sviluppato per valutare i deficit cognitivi nelle disabilità intellettive ed è l'endpoint primario di efficacia nel progetto ICOD e nello studio NIUS.

Background: "Down syndrome (DS) is the genetic manifestation of trisomy of chromosome 21. DS is associated with neuropathological alterations in both neuronal proliferation and differentiation, manifesting in alterations in cognitive and behavioral functioning across the lifespan. DS is estimated to occur once in every 700-800 live births with a global incidence of more than 200,000 cases per year; however, this may be an underestimate of the incidence during pregnancy due to the rate of both spontaneous and elective abortions. The diagnosis of DS is typically made through genetic karyotype testing, with post-natal confirmation via

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

the identification of characteristic syndrome-based physical and/or medical features. The distal part of the long arm of chromosome HSA21 is recognized as the Down syndrome critical region and it is specifically associated with intellectual disability (ID). Recent advances in medical treatment including surgical correction of congenital heart disease, treatment of endocrine disease and hematologic malignancies have led to a significant increase in the life expectancy of people with Down syndrome. The increasing longevity of these patients supports the need to develop an effective treatment to improve their cognitive capacity and quality of life. The treatment of cognitive symptoms has had limited results to date. In cognitive studies a primary objective of animal research is to identify interventions that may promote cognitive improvement or delay or reverse cognitive decline in humans. Recent advances in the standardization of cognitive assessment tools for humans have the potential to bring preclinical work closer to human research in different pathologies with cognitive dysfunction. However, although lot of preclinical studies with trisomic mice shown encouraging outcomes, in clinical research the results has been not like as favorable. For now, the instruments used in translational studies related to cognition have not been precise, so that the University of Bordeaux has developed a two-stage radial-maze task similar for mice and humans. This instrument seeks to compare cognitive performance of mice and humans as a tool useful in this kind of studies. The aim of this instrument is to assess cognitive domains of memory (relational memory) and executive functions (working memory), both goals in clinical trials for enhance cognitive performance in DS population. Additionally, the National Institute of Health (NIH) has developed a new tool for the assessment of cognition, the NIH Toolbox cognitive battery for intellectual disabilities (NIH-TCB-ID). It has been already used in longitudinal, epidemiological, and interventional studies and has demonstrated a good construct validity when administered to patients with intellectual disabilities and, interestingly, all the subtest that compose the NIH-TCB-ID have been paralleled to behavioral tasks used in preclinical models. This neuropsychological battery allows the study of multiple cognitive domains including language, cognitive flexibility, inhibitory control and visual attention, processing speed, episodic memory and working memory, becoming an important instrument for assess effectiveness in clinical trials, characteristic that has been highlighted by the European Medicines Agency (EMA). In this context, the purpose of this study is to evaluate the usability of the Bordeaux Maze Test for assess working memory and the NIH-TCB-ID in Italian population. A secondary objective will be to explore the activity of the endocannabinoid system using different biological matrices (hair and plasma)."

Hypothesis and Significance: "Down syndrome (DS) is the most common chromosomal abnormality in children leading to lifelong intellectual disability. Over one million people in the EU and US have DS, and its prevalence has increased in the last ten years. Thanks to significant advances in medical and social care, the life expectancy of individuals with DS has increased greatly, so that many of them reach even the age of 60-70. DS causes lifelong cognitive dysfunction, which results in important negative consequences for these individuals, their families and society. Despite the heavier social burden and the greater medical needs linked to this intellectual disability, there isn't an approved therapy for DS-related cognitive dysfunction yet. Furthermore, though there are specific cognitive screening tests designed for individuals with DS, no official guidelines have been developed to assess their cognitive deficits or their impact on quality of life of DS individuals and their families. Further challenges to be met include the difficulty in dissecting age-related cognitive decline from the underlying intellectual disability, and the lack of international consensus on validated and accepted cognitive psychometric tools able to detect the potential clinical efficacy of a new drug both at preclinical and clinical levels. Aim of this Non-interventional, multicentric study (NIUS study) in male and female adult subjects with Down syndrome is to evaluate the usability of the Bordeaux Maze Test for assess working memory and the NIH-TCB-ID in Italian population. A secondary objective will be to explore the activity of the endocannabinoid system using different biological matrices (hair and plasma)."

Specific Aims: "The main objectives of this study are to assess the cognitive tools that will be used in the Study AEF0217-201 (ICOD 2) and in the same environmental conditions.

Specifically:

To evaluate the usability of the NIH-TCB-ID in a Down syndrome adult population.

To evaluate the usability of the Bordeaux maze test working memory task in a Down syndrome adult population.

Secondary objective:

Exploring the activity of the endocannabinoid system using different biological matrices (hair and plasma)

Primary and secondary endpoint(s)\Primary "endpoint" The assessment of the usability of the translated versions of the NIH-TCB-ID and the Bordeaux Maze tests in a Down syndrome adult population will follow a methodology summarized in a Usability Testing in Dow syndrome guide name USATESTDOWN <http://www.healthmeasures.net/explore-measurement-systems/nih-toolbox/intro-to-nih-toolbox/available-translations>

Secondary "endpoint"

Analysis of endocannabinoids in different biological matrices (hair vs. plasma)

Study periods\nFor each subject, the expected duration of their participation will be of 1 month including two visits, consisting

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

on the following:

Visit 1: Baseline

Signature of the informed consent

Intelligent quotient (IQ) assessment

Verify karyotype (otherwise offer karyotyping)

Clinical evaluation of Language Fundamentals

Dementia screening questionnaire for Individuals with Intellectual Disabilities

tPsychiatric Assessment Schedule for Adults with Developmental Disabilities Checklist (PAS-ADD checklist)

NIH Toolbox cognitive battery

Bordeaux Maze test

Visit 2: 1 month after baseline visit:

NIH Toolbox cognitive battery for intellectual disabilities

Bordeaux Maze test working memory task"

Expected outcomes: We expect to demonstrate the usability of the Bordeaux Maze Test for assess working memory and the NIH-TCB-ID in Italian population. This will help us to conduct a clinical trial to assess efficacy and safety of a cognitive enhancer in individuals with Down syndrome is planned (ICOD project, Phase II study). Therefore, the selection of instruments that reliably measure cognition in these subjects is critical before initiating such a clinical drug trial in a novel indication.

Significance and Innovation: Down syndrome individuals are a population with high healthcare costs. Their intellectual disabilities make them nearly 4 times as likely to incur high annual health care costs than those without intellectual disability (due to continuing care/rehabilitation costs, medication costs with more intense monitoring for adverse effects). The final goal of the NIUS project is to make available an innovative diagnostic approach, offering people with DS and their families a new approach for the diagnosis and evaluation of drugs efficacy of DS-related cognitive dysfunction.

Translational relevance: The translational relevance of this project is high with a relevant impact on the National Health System, because it offer an innovative approach for the diagnosis and treatment of cognitive deficits in Down Syndrome.

08 : Identificazione dei recettori metabotropici nella microglia umana come nuovi target per strategie di neuroprotezione

Responsabile: CARACI FILIPPO

Programma:

Parole chiave: Neuroprotezione, microglia, nuovi farmaci, recettori metabotropici per il glutammato, TGFbeta1

Altri enti coinvolti: IRIB-CNR Maria Vincenza Catania, Michela Spatuzza, Simona D'Antoni

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Terapeutica

Project Classification IRG: Brain Disorders and Clinical Neuroscience

Project Classification SS: Cell Death in Neurodegeneration - CDIN

Descrizione: Le cellule della microglia sono cellule della linea mieloide che risiedono nel parenchima cerebrale e sono fondamentali nei fenomeni di neuroinfiammazione. Oltre alle funzioni immunitarie, le cellule microgliali svolgono un ruolo fisiologico importante in altri processi cerebrali, quali la modifica delle connessioni neuronali durante lo sviluppo, i meccanismi di plasticità sinaptica e la regolazione della neurogenesi. Di contro, l'attivazione microgliale cronica è considerata dannosa e rappresenta un meccanismo patogeno comune a diversi disturbi neurologici. L'attivazione microgliale consiste di due cambiamenti principali: in primo luogo, una modifica della forma cellulare da una morfologia altamente ramificata a una forma ameboidi, e quindi la trasformazione di queste cellule ameboidi in fagociti attivi (Hanisch and Kettenmann, Nat Neurosci 2007; 10(11): 1387-94). La microglia attivata produce molte citochine pro-infiammatorie, quali interleuchina (IL)-1 β , IL-6, fattore di necrosi tumorale (TNF)-beta, specie

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

reattive dell'ossigeno (ROS) e ossido nitrico (NO), la cui funzione ha lo scopo di eliminare definitivamente gli agenti patogeni e ristabilire l'omeostasi tissutale. D'altra parte, la clearance dei detriti cellulari ad opera della fagocitosi microgliale può verificarsi senza indurre tossicità quando vengono rilasciati citochine e mediatori antinfiammatori, come IL-10 e il TGF- β (transforming growth factor- β) (Ransohoff and Perry, *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 119-45). L'omeostasi tissutale è pertanto garantita da un equilibrio tra risposta pro-infiammatoria e anti-infiammatoria. Se l'esposizione a segnali potenzialmente dannosi è sostenuta e prolungata nel tempo, l'attivazione pro-infiammatoria della microglia può prevalere e contribuire al danno neuronale, come in diversi disturbi neurodegenerativi.

Nella patogenesi delle malattie neurodegenerative un ruolo fondamentale è svolto dalla disfunzione della trasmissione glutammatergica (Nguyen et al. 2011 *Cell Death Dis.* 2:e240). Il malfunzionamento o l'espressione aberrante dei trasportatori del glutammato porta infatti all'accumulo di questo neurotrasmettitore seguito da una sovra-attivazione dei recettori ionotropici del glutammato, principalmente recettori NMDA. L'attivazione del recettore NMDA e / o AMPA privo della subunità GluR2 (Dugan and Choi, 1994 *Ann. Neurol.* 35(Suppl.), S17; Zipfel et al., 2000 *J. Neurotrauma* 17 857-869), porta ad un eccessivo afflusso di Ca⁺⁺ extracellulare che innesca una cascata di eventi che portano alla morte apoptotica e necrotica. Ciò si verifica sia in condizioni neurodegenerative acute che croniche come AD, ischemia, SLA (Hardingham and Bading, 2003 *Trends Neurosci.*, 26 81-89.). L'eccitotossicità e la neuroinfiammazione sono strettamente interconnesse poiché l'aumento dei livelli extracellulari di glutammato favorisce l'attivazione delle cellule gliali e la promozione dei fenomeni neuroinfiammatori nel cervello (Olmos and Llado, 2014 *Mediators Inflamm.* 2014:861231).

I recettori metabotropici per il glutammato, per la loro azione modulatoria nei confronti della trasmissione eccitatoria sono considerati eccellenti candidati come farmaci neuroprotettivi. I recettori metabotropici del glutammato (mGlu) sono recettori accoppiati proteine G appartenenti ad una famiglia di otto sottotipi (mGlu1 a -8), di cui i recettori mGlu1 e -5 sono accoppiati alle proteine Gq/11, e tutti gli altri sottotipi alle proteine Gi/o. recettori mGlu sono ampiamente espressi nel sistema nervoso centrale, nei neuroni e nelle cellule gliali. Spesso appaiono sovraespressi in aree coinvolte nella neurodegenerazione, dove possono modulare la trasmissione glutammatergica (Nicoletti et al., *Neuropharmacology* 60 1017-1041). Da notare, l'upregulation del recettore mGlu può coinvolgere la microglia o gli astrociti, nei quali la loro attivazione causa il rilascio di fattori potenzialmente in grado di influenzare la morte neuronale. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono la presenza dei recettori mGlu nella microglia con effetti che mediano la chemiotassi o la sintesi di fattori neurotossici o neuroprotettivi (Liu et al., 2009 *Eur. J. Neurosci.* 29 1108-1118, 2009). Tutti gli studi citati riguardanti la attivazione e la funzione microgliale sono state effettuati in modelli sperimentali di roditori, mentre la caratterizzazione delle cellule umane è stata limitata a causa della limitata disponibilità di fonti primarie di microglia umana. Per superare questo problema, sono state sviluppate linee cellulari microgliali immortalate dall'uomo, quali le cellule HMC3, descritte di seguito.

Obiettivo del progetto è la caratterizzazione dell'espressione dei recettori metabotropici per il glutammato nelle linee cellulari di microglia umana e lo studio degli effetti della stimolazione con agonisti o antagonisti dei sottotipi espressi sulla produzione di citochine e di fattori neurotrofici, in condizioni normali e a seguito di esposizione a LPS e/o INF gamma.

Risultati e prodotti Risultati 2022:

conseguiti:

Le cellule microgliali rappresentano le cellule immunitarie del sistema nervoso centrale (SNC) e svolgono un ruolo chiave nello sviluppo del cervello, nella memoria, nella plasticità sinaptica e nella neurogenesi. Le cellule HMC3 originariamente prodotte dal laboratorio del Prof. Tardieu e successivamente trasferite a ATCC e quindi autenticate e distribuite (ATCC®CRL-3304) sono state utilizzate per mettere a punto il modello di neuroinfiammazione. La linea cellulare HMC3 microgliale umana è stata coltivata in minimal essential medium (MEM) contenente siero bovino fetale (FBS) (10% v/v), come descritto (Germelli et al., *Int J Mol Sci* 2021, 22.). La linea cellulare HMC3, coltivata in fiaschette da 75 mL, è stata mantenuta in un ambiente umidificato a 37 °C e al 5% di CO₂/95% di atmosfera e passata ogni 3-5 giorni a seconda della confluenza delle cellule per evitare la crescita eccessiva delle cellule. Il giorno prima del trattamento, le cellule sono state raccolte usando 2,5 ml di soluzione di tripsina-EDTA, contate e seminate in piastre da 6, 24, 48 o 96 pozzetti alla densità appropriata. L'effetto della stimolazione con LPS (100 ng/ml per 24 ore) più ATP (5 mM per 30 min) sulla vitalità delle cellule HMC3 nelle diverse condizioni sperimentali è stato misurato mediante saggio MTT e esclusione del trypan blu. Nel primo anno del progetto, abbiamo prima studiato il potenziale tossico della combinazione LPS + ATP sulle HMC3. Il trattamento delle cellule HMC3 con LPS + ATP ha ridotto significativamente il numero di cellule vitali rispetto alle cellule HMC3 non trattate. Il trattamento delle HMC3 con LPS + ATP è stato in grado di aumentare significativamente la concentrazione intracellulare di ROS rispetto a quella osservata nelle cellule mantenute come controllo (p < 0,001) ed ha causato un profondo squilibrio energetico cellulare, come dimostrato dal calo del 32% della concentrazione di ATP (p < 0,001 vs CTRL) e dagli aumenti del 42% e 218% dei livelli di ADP (p < 0,01 vs CTRL) e AMP (p < 0,001 vs CTRL). Lo stimolo pro-infiammatorio indotto dal trattamento con LPS + ATP ha anche causato una sovrapproduzione sostenuta dei prodotti finali stabili del catabolismo di NO, cioè nitriti (+31%, p < 0,05) e nitrati (+289%, p < 0,001), culminando quindi in una condizione di stress nitrosativo.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

Attività previste Attività 2023:

Avendo adesso messo a punto il modello di neuroinfiammazione con LPS + ATP, studieremo in tale modello l'espressione dei recettori mGlu ed effettueremo trattamenti farmacologici con agonisti/antagonisti dei recettori mGlu, valutazione della produzione di citochine mediante PCR quantitativa e ELISA, studio dell'espressione dei recettori mGlu mediante RT-qPCR e Western blotting. Sarà inoltre valutato nelle HMC3 il potenziale impatto della carnosina in termini di effetti protettivi.

Espressione genica. L'analisi dell'espressione genica sarà effettuata impiegando qRT-PCR come descritto in precedenza [Caruso et al. Cells 2019, 8] con lievi modifiche.

Espressione proteica. L'analisi dell'espressione proteica sarà effettuata utilizzando l'analisi WB su lisati cellulari come descritto in precedenza [Caruso et al. Cells 2019, 8, Fresta et al., Int J Mol Sci 2020, 21.], con lievi modifiche. I livelli intracellulari di ossido nitrico, superossido e perossinitrito saranno determinati utilizzando la microscopia a fluorescenza accoppiata a sonde fluorescenti specifiche: 4-Ammino-5-Metilammino-2',7'-Difluorofluoresceina Diacetato (DAF-FMDA) per NO e MitoSOX per superossido [Caruso et al. Cells 2019, 8; Caruso et al. Antioxidants (Basel) 2019, 8.] e Sensore 3 per perossinitrite [Caruso et al., Biomedicines 2021, 9.].

Background: Microglia are a subtype of brain glial cells and constitute up to 10% of all cells in the healthy human cortex (by comparison, neurons represent 21% (Mittelbronn et al. Acta Neuropathol 2001, 101, 249-255). As the resident macrophages of the brain, they have the capacity to migrate, proliferate and phagocytize (Kettenmann et al., Physiol Rev 2011, 91, 461-553.). One of their most striking features is the frantic morphological changes that they exhibit even in healthy tissue, relentlessly extending and retracting processes to physically scan their territories (baseline surveillance) (Nimmerjahn et al. Science 2005, 308, 1314-1318). Emerging data indicate that microglia also influence brain development, synaptic plasticity, neurogenesis, memory, and mood under quiescent physiological conditions (Yirmiya et al., Trends Neurosci 2015, 38, 637-658.). Deviation from microglial homeostasis, caused either by microglial activation during inflammatory conditions (e.g., infections, stress, stroke, or neurodegenerative diseases) or by microglial decline and senescence (e.g., during aging or chronic unpredictable stress), can lead to neurodegenerative disorders and associated impairments in neuroplasticity and neurogenesis. In particular, because of their dual-nature, as glial cells and macrophages, microglia are the most likely brain cells to detect and quickly adapt to the changes occurring in pathologies such as mild cognitive impairment (MCI) (Okello et al., Neurology 2009, 72, 56-62), Alzheimer's disease (AD) (Solito and Sastre, Front Pharmacol 2012, 3, 14.) as well as major depressive disorder (MDD) and bipolar disorders (BD) (Tay et al. Front Mol Neurosci 2017, 10, 421.6). Parbo et al. provided evidence that microglial activation occurs in MCI, the clinical prodrome of AD, and that the magnitude of microglial activation is related to the amount of amyloid deposition in certain neocortical regions. Microglia are also involved in the regulation and production of serotonin of which an imbalance has been implicated in BD (Watkins et al. Transl Psychiatry 2014, 4, e350.). Taking into consideration the above-mentioned evidence along with the distinct mesodermal origin and genetic signature of microglia in contrast to other neuroglial cells, microglia represent an interesting target for the development of therapeutics. Either microglia-suppressing or -stimulating drugs can represent therapeutic treatments, depending on the microglial status of the patient.

Hypothesis and Significance: We hypothesize that human microglia express mGlu receptors, namely mGlu3 and mGlu5. We also hypothesize that activation of mGlu3 can activate production of TGF beta, thus exerting a neuroprotective role, whereas activation of mGlu5 may increase production of detrimental cytokines, such as IL-6 and IL-1beta. Furthermore, we also hypothesize that the expression levels of mGlu receptors after exposure to oxidative stress may change, thus changing the modulatory effect of mGlu activation. This is an important issue considering that oxidative stress is increasing during aging and neuroinflammation.

Specific Aims: Aim of the project is the characterization of the expression of metabotropic glutamate receptors in human microglia cell lines and the study of the effects of stimulation with agonists or antagonists of the expressed mGlu receptor subtypes on the production of cytokines and neurotrophic factors, under normal conditions and following exposure to LPS and/or INF gamma.

Expected outcomes: By analogy with rodent microglia, we expect to find the expression of mGlu3 and mGlu5 receptor subtypes in human microglia. We expect to find that the production of cytokines and growth factors will be modulated by activation or inhibition of mGlu receptors.

Significance and Innovation: Most studies involving the function of microglial cells have been carried out in rodent microglia, while data in human microglia are limited. Specifically, the expression of mGlu receptors and their ability to modulate production and secretion of neurotoxic or neuroprotective factors is unknown. mGlu receptors are considered potential drugs in neurodegenerative diseases for their modulatory role on glutamatergic transmission, whereas

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

much less is known regarding modulation of crosstalk between microglia and other cell in the nervous system. Our results might disclose new mechanisms involving microglia for mGlu receptors as potential neuroprotective drugs.

Translational relevance: Neurodegenerative diseases are incurable and debilitating conditions that result in progressive degeneration and / or death of nerve cells and affect millions of people worldwide. They include Alzheimer's disease (AD) and other dementias, Parkinson's disease (PD) and PD-related disorders, Motor neurone diseases (MND), Huntington's disease (HD) and several forms of ataxias. The risk of being affected by a neurodegenerative disease increases dramatically with age. While life expectancy is steadily increasing, more people may be affected by neurodegenerative diseases in coming decades. This situation creates a critical need to improve our understanding of what causes neurodegenerative diseases and develop new approaches for treatment and prevention. Although treatments may help relieve some of the physical or mental symptoms associated with neurodegenerative diseases, there is currently no way to slow disease progression and no known cures. Microglial cells represent important actors in the mechanisms of neuroinflammation, which can trigger and sustain neurodegeneration. Modulation of neuroinflammation by activation or inhibition of mGlu receptors present in microglia may represent a potential therapeutic strategy targeting a critical mechanism underlying neurodegeneration.

Linea di ricerca n. 5 : Progetti Eranet e Ministero affari esteri e Progetti di rete

02 : EURONANOMED III 2019 - Nanodiagnosis for Betalactam Hypersensitivity (DrNanoDAI)

Responsabile: Pettinato Rosa

Programma:

Parole chiave: Betalactams, Allergy, Dendrimers, Diagnosis, IgE, Basophil, Nanoparticles

Altri enti coinvolti: (1) Project coordinator: Instituto de Investigacion Biomedica de Malaga (IBIMA)- Fundacion Publica para la Investigacion de Malaga en Biomedicina y Salud (FIMABIS)
(2) University of Malaga; Andalusian Centre for Nanomedicine and Biotechnology-BIONAND
(3) Inserm and University of Lorraine
(4) IRCCS Oasi Maria SS.
(5) DIATER Laboratorio de Diagnósticos y Aplicaciones Terapéuticas, S.A

Anno inizio: 2020

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Diagnostica

Project Classification IRG: Immunology

Project Classification SS: Hypersensitivity, Autoimmune, and Immune

Descrizione: Unlike natural or synthetic carriers, dendrimers feature nanosized structural precision, globular shape and multivalency, making them ideal carriers that show higher capture likelihood compared to linear polymers of the same molecular weight. Their potential for emulating the protein in conjugates for sIgE recognition to BL has been confirmed in collaborative P1 & P2 studies. The use of hybrid nano-materials that combine NPs (with high functionality surface area) with dendrimers (well-defined building blocks with reactive functional groups to couple the BL), allows a high density of haptens on a solid phase compared to conventional immunoassays. The larger interaction area of NPs will allow a higher capture of IgE compared to conventional materials, improving sensitivity. Silica-based materials are new candidates for solid supports, and their surface modifications, synthetically controlled, can be tuned providing versatile scaffolds for detecting sIgE to a wide range of BLs. The effect on basophil degranulation depends not only on the antigen density but also on the proximity of IgE epitopes. Thus, NPs of different sizes will enable the analysis of the functional interaction with sIgE bound on basophils, either stimulating or inhibiting their activation. The need for nano: The solution for structural precision. To minimize inter-/intra-assay variation coefficients, monodisperse dendrimers offer advantages: i) over proteins, of presenting a higher density of haptens; ii) over polydisperse

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

polymers, of a controlled and exact number of haptens, resulting in high reproducible materials. The coupling of DeAns on NPs will allow: (i) in immunoassays, due to magnetic properties, an easy handling and quicker assays; ii) in BAT in which the distance between epitopes is crucial for activation, due to controlled nano-size, to investigate the optimal distance for getting maximal activation.

The main unmet medical need is the requirement of an in vitro tool for BL-allergy diagnosis with a sensitivity and accuracy level that responds to the diversity of BL currently prescribed throughout Europe and the evolution of this prescription overtime.⁴ A recent EAACI task force, with the participation of P1, P3 & P4, has reached a general consensus about the need to validate new tests in large cohorts of well-characterized allergic patients. This project is highly implicated with Safe Medical Design aiming to improve patient safety while reducing overall health care costs in routine medical procedures.

Risultati e prodotti conseguiti: Preliminary results:

Clinical. BL allergy is self-reported by 10% of the population with drug adverse reactions and has implications for patient security and health system costs since alternative antibiotics can induce more bacterial resistance and adverse effects, and are more expensive. However after allergological work-up less than 30% of adults and 10% of children are confirmed as allergic. This work-up includes a detailed clinical history, and skin test (ST) and drug provocation test (DPT), which are time consuming and not risk-free. Therefore, the most rational alternative is to use in vitro tests, as immunoassays and basophil activation test (BAT), although they show restricted accuracy and insufficient sensitivity. Immunoassays sensitivity is estimated on 40-60%, depending on the clinical manifestation² and the BL involved. BAT has shown a similar sensitivity and can be used for a wider range of BLs,^{13,14} although the underlying mechanism for activation is not completely known, hampering its clinical application. Most DrNanoDAI partners have been collaborating for more than a decade for improving in vitro diagnosis of IgE-mediated reactions to BLs, with studies originally focussed on benzylpenicillin (BP) and later on amoxicillin (AX), due to prescriptions changes. In fact, differences among BL-consumption in Europe influence the culprit BL and diagnostic approaches, being now under analysis (P1, P3, P4) within the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). Differences in the approach between USA and Europe have been analysed in detail by American and European experts, with P1 & P4 actively participating.¹⁵ Moreover, P1 to P4 have a close collaboration with P5, which has licensed a P1 patent "Composition of CLV and its use for allergy diagnosis" (ES2357595B1), currently the only available reagent for performing ST exclusively to CLV. P5 is also interested in licensing other P1/P2 patent "Useful composition for detecting clavulanic acid allergy" (PCT/ES2017/070588), synthetic determinants of CLV that have shown to significantly improve the sensitivity of BAT to CLV.¹⁶ Indeed, P1, P2 & P5 have recently signed a framework agreement that reinforces the collaboration, translatability, and marketability of the results in a near future.

Immunoassays. P1, P2, P4 & P5 collaborations have been focussed on the analysis of BLs IgE recognition including penicillins (PENs) and cephalosporins (CEPHs) in Italian and Spanish populations. Data obtained by immunoassays using radioallergosorbent test (RAST), with cellulose discs as solid phase, showed different patterns of IgE recognition to PEN and CEPHs. Moreover, the analysis of cross-reactivity between BLs has indicated that it is higher between PENs and 1st and 2nd CEPH generations. Equivalent results were obtained by collaborative studies (P1, P3, P4) using a drug coupled to sepharose for radioimmunoassay (RIA), which correlated with patients clinical reactivity. RAST and Sepharose-RIA had higher sensitivity for detecting specific IgE (sIgE) to BLs compared to commercial tests (P1, P3). Moreover, a RAST including two different PEN has been developed showing good sensitivity and specificity (P1, P2, P3). Collaborative studies (P3, P4) have changed the paradigm that high cross-reactivity exists between carbapenems and PENs and CEPHs, showing that this accounts for less than 1%. The sensitivity of the tests can be affected by many factors including the time interval between the reaction and the test, since levels of sIgE tend to decrease over time, the BL determinants and carrier molecule used, and even how BL-carrier conjugates are bound to solid phases. Regarding the immunochemical characterization of BL determinants, P1 & P2 collaborative studies have highlighted the importance of the side chain structure. Studies with CEPHs (P1, P3, P4) have demonstrated that only particular fragments of the drug contribute to the antigenic determinants especially the R1 side chain. These studies settled that BL allergic patients can often tolerate other BLs derivatives and helped to choose a safe alternative. The importance of the carrier molecule was demonstrated in a collaborative study, with poly-L-lysine and an aminospacer offering increased sensitivity and specificity over human serum albumin conjugated to BP. With the input of chemistry and nanotechnology expertise of P2, the consortium has made a great effort to apply the use of nanostructures to improve in vitro test sensitivity, specifically in modifying immunoassay solid phases. The inclusion of nanostructures as carriers has allowed us to optimize BL IgE recognition in immunoassays. We have designed nanoconjugates, consisting of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decorated with PEN, which permits working with multivalent and tridimensional structures of precise sizes and a defined number of peripheral functional groups. These nanoconjugates have also been decorated with two different PENs (BP and AX) to yield bi-epitope dendrimeric

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

antigens (DeAns) that diagnose patients allergic to any of these two drugs with a single test, and represent the basis for a broadly-applicable in vitro assay. Other approaches to increase the sensitivity of the immunoassays are related to different methods to activate the solid phase (cellulose). Results showed that the use of alfa-bromoisobutyryl bromide and oligoethylenglycol spacers³ improved the in vitro sensitivity in agreement with the higher density of conjugates on the surfaces. Moreover, these DeAns have shown promising diagnostic applications when anchored on different solid supports besides cellulose such as zeolites, silica nanoparticles (NPs) and gold surfaces. The latter with nanoplasmonic sensor technology shows exceptional results achieving extremely low detection limits. Apart from the diagnostic role, properties of NPs themselves can influence the immune response, as P1 has shown. Actually, P2 possesses high experience in the development of effective protocols for the chemical

modification of different surfaces (cellulose,^{3,46,47} zeolites,³ gold⁴⁸ and specially silica NPs), including the covalent binding of different molecules directly on the NP surface or through a linker. This group controls all techniques involved in nanomaterial characterization ensuring not only the synthesis of monodisperse NPs but also a homogeneous and well defined surface modification. Moreover, P2 has demonstrated great (supramolecular/physicochemical) expertise in the design/preparation/characterization of the dendrimer-nanoconstructs in other fields different from allergy application.

Basophil activation tests. BAT has been used as a functional test for diagnosing BL-induced-IgE-mediated reactions being especially useful with BLs recently identified as culprits, as clavulanic acid (CLV) for which there is no other in vitro diagnostic assay. Recent studies (P1, P2) using this method have clearly demonstrated that: (i) AX combined with CLV is the BL involved most often in IgE mediated reactions in both children and adults in Spain; (ii) patients can be allergic to AX, CLV or simultaneously to both; (iii) the inclusion of CLV is critical for increasing BAT sensitivity; and (iv) CLV determinants recognized by sIgE bound to basophils consist of very small drug fragments that react to proteins (P201631133). In addition, preliminary BAT studies with nanostructures (P1, P2) have demonstrated the potential of BL-DeAns decorated with BP or AX, for specifically activating basophils, highly influenced by the size of the carrier and

the density of drugs. P1 & P5 collaboration have shown that histamine release test, based also in basophil activation, is useful in the diagnosis of BL allergy. The standardization and validation of this method is one of the objectives of EUROBAT workgroup (www.eaaci-eurobat.org) in which P1 participates. Additionally, this workgroup has pointed out the importance of increasing the knowledge about the drug-sIgE interactions at basophil surfaces and subsequent mediator release, being nowadays clear that measuring only one mediator is not sufficient to diagnose IgE-mediated reactions, and indicating the need for searching optimal biomarkers to confirm the diagnosis. DrNanoDAll is motivated by the idea that the combination of a detailed and precise clinical description of the reaction with information obtained by in vitro diagnostic methods together with innovative -omic approaches will permit a better understanding of the global mechanism and an improved diagnosis. Multi-omics workflow that includes analysis of transcriptomics (RNA-seq), proteomics and metabolomics data using an integrative omics profile (iPOP) approach⁶³ has proven to be very efficient for evaluating infectious and autoimmune diseases and thus could be used for testing for major changes after cell exposure to NPs decorated with BL-DeAn. In this sense, partners have a great experience, and specifically P3 has contributed to a better understanding of mediator release in drug hypersensitivity reactions both IgE and non IgE-mediated in collaboration with P1. The members of DrNanoDAll have a large collaborative experience achieving relevant results, including improvement of in vitro test sensitivity and knowledge of basophils activation mechanisms, placing them in an ideal position to reach the proposed objectives successfully.

Attività previste P1 will coordinate the consortium and will be in charge of: (i) Phenotyping of cases with IgE-mediated reactions to BLs and controls, and collection of samples (sera and cells) that will be sent to the HRUM-IBIMA Biobank; (ii) Studies of the immunological recognition of the different NPs; (iii) Isolation and stimulation of basophils for different "omic" analysis; (iv) NPs based in vitro tests (immunoassay and BAT) validation studies in a large group of Spanish patients. P2 will be in charge of the synthesis and full characterization of magnetic and non-magnetic NPs, as well as their surface modification with dendrimers or DeAn. P3 will carry out: (i) Phenotyping of cases with IgE-mediated reactions to BLs and controls and collection of samples that will be sent to the HRUM-IBIMA Biobank; (ii) Mediators of anaphylaxis release studies upon basophil activation with non-magnetic NPs; (iii) Measurement of soluble peptides and small lipid released by cells activated by NPs by ζ omic ζ determination; (iv) Protein plasma membrane analysis; (v) NPs based in vitro tests (immunoassay) validation studies in a large group of French patients. P4 will be in charge of: (i) Phenotyping of cases with IgE-mediated reactions to BLs and controls and collecting samples that will be sent to the HRUM-IBIMA Biobank; (ii) Isolation and stimulation of basophils for different "omic" analysis; (iii) NPs based in vitro tests (immunoassay and BAT) validation studies in a large group of Italian patients, both adults and children. P5 will be in charge of scaling up the synthesis of optimized NPs, as well as the technical validation of both immunoassays with

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

magnetic NPs and BAT using non-magnetic NPs.

All partners will participate in the dissemination, exploitation of the results and RRI monitoring (WP7).

Objectives:

DrNanoDAll will develop innovative in vitro tools for diagnosing IgE-mediated reactions to BLs, based on immunoassays for determining serum sIgE, and on cellular tests for detecting sIgE bound to effector cells, such as basophils. This approach will improve clinical practice, allowing physicians to avoid complex and risky in vivo diagnostic procedures such as ST and DPT. DrNanoDAll proposes the development of a new nanoscaled strategy based on the use of hybrid organic-inorganic composites that include NPs decorated with different BL-DeAn for diagnosing BL allergy. New procedures for synthesizing soluble and solid supported BL-DeAn will be established and immunological recognition assessed. The project will have future impact on personalized therapeutic strategies. This proposal is based on a multidisciplinary approach carried out by clinicians with drug allergy expertise in both adults and children; chemists, with expertise in nanostructures, solid phase and BL chemistry, and biosensors; and biologists, with expertise in immunology and cellular biology. All partners of the consortium, with complementary fields, have been collaborating for a long time on drug allergy and nanomedicine.

This is a translational research project that combines innovative approaches on the fields of nanomedicine with immunological and clinical applications, with private-public participation, with clinical and academia research groups involving 8 MD and 9 Junior Investigators (PhD).

Background: Betalactam (BL) allergy is self-reported by approximately 10% of the population with adverse drug reactions, being those induced by an IgE mediated mechanism the most frequent. This has implications for patient safety and health system costs since alternative antibiotics can induce bacterial resistance, be more expensive and be potentially more toxic. IgE-mediated BL allergy varies among patients with some reacting to one BL and others to several; this can change over time and differs between European countries depending on consumption.

Hypothesis and Significance: Betalactam (BL) allergy is self-reported by approximately 10% of the population with adverse drug reactions (ADR), being most frequently induced by an IgE mediated mechanism. This ADR has implications for patients safety and Health Systems costs since prescription of alternative antibiotics could induce bacterial resistance, could be more expensive and could potentially be more toxic. IgE-mediated BL allergy varies among patients, with some reacting only to one BL and others to several of them; it tends to change over time and differs between European countries, depending on BL consumption.

BL allergy diagnosis is challenging, relying on patient clinical history, in which previous BL-ADR evidence are often inaccurately reported; and on drug provocation and/or skin tests, which are not risk-exempt and require specialized healthcare professionals for results interpretation and patient management.

In vitro testing stands out as the more rational alternative diagnostic method, showing however various limitations, such as low sensibility. Immunoassay for quantifying specific IgE is the most used one, although limited to few BLs. Basophil activation test is also used, although the lack of knowledge about the activation mechanisms has hampered a wider clinical application. Thus, nowadays these tests do not fulfil the clinician's needs.

DrNanoDAll proposes the development of nanoparticles decorated with BL dendrimeric antigens, innovative solutions to surpass the current limitations. In order to offer new in vitro tools for BLallergy accurate diagnosis, this proposal will combine nanotechnological and immunological approaches with BL-allergy clinical expertise, implementing a multi-omics workflow and involving the industry for scaling up nanomaterials and clinical test validation steps.

This European-wide collaboration will be crucial to generate a new BL-allergy diagnosis tool suitable for personalized medicine, which will impact positively on the European Health Systems.

Specific Aims: 1) Synthesis of hybrid nanocomposites of several sizes decorated with different BL-DeAn (BL-DeAn@NPs): non-magnetic (to be used in BAT) and magnetic (to be used in immunoassays).
2) Analysis of the immunological recognition of (i) magnetic NPs by sIgE from sera of allergic patients; (ii) non-magnetic NPs by determining basophil activation through IgE bound to Fc ϵ RI.
3) Assessment of the release of conventional inflammatory mediators, such as preformed mediators, newly generated pro-inflammatory lipid mediators or newly synthesized growth factors, cytokines and chemokines, upon basophil activation after the

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2023

Progetti

Associazione Oasi Maria SS

non-magnetic NPs exposure.

4) Search and selection of the most sensitive markers of the cell activation produced by non-magnetic NPs using a multi-omics workflow.

5) Evaluation of the diagnostic capacity of immunoassay (using magnetic NPs) and BAT (using non-magnetic NPs) in a wide population of patients, including adults and children with different patterns of IgE recognition to BL.

Expected outcomes: We expect to improve existing diagnostic tests or even, for some BLs, to offer the first available in vitro diagnostic assay, having a direct impact on clinical practice with faster and safer diagnostic methods, reducing the cost to public health systems. These results will provide new guidelines for the diagnosis of allergic reactions to BLs where in vitro test will have a relevant role. In addition, this model could be later applied for diagnosing other frequent drug allergies.

Significance and Innovation: There is a great heterogeneity in the BL involved in the reaction throughout Europe, being penicillin V and BP the most frequently involved in Northern Europe, AX in UK, AX and CLV in Spain and PEN, AX and CEPH in Italy and France. These differences are related with the pattern of BL consumption (www.ecdc.europa.eu). Moreover, patients can develop different patterns of IgE-mediated allergic response. In that sense they can react to the whole group of BLs, to a specific group such as PENs or CEPHs, or have a selective reaction to a specific BL with good tolerance to other BLs even from the same group. Patients allergic to AX and with good tolerance to penicillin V and BP (pattern representative of Spain) or allergic to cefuroxime with good tolerance to other CEPHs with different side chains (pattern representative of Italy) can have many alternative BL treatments, whereas a patient with allergy to the whole group of BL will have fewer alternatives. Therefore an in vitro test that takes into account all these heterogeneous responses will be of great value for European countries, which will allow clinicians to perform an accurate diagnosis. This is of relevance in pediatric population in which only the 10% of initial cases are finally confirmed. The collaborative work of the consortium will make possible a quick development of this innovative approach for diagnosis and management of BL allergy, which would not be able to accomplish by each individual partner. This international collaboration will allow young investigators to acquire skills in a multidisciplinary project with a common objective, as well as to expand their network. The challenge of DrNanoDAll is to integrate enterprise, research centers from the public health system and the academia with a different vision of the problem and will provide different and complementary approaches. This collaboration will allow the study, analysis, understanding and management of the immunological basis of BL allergy from the molecular level to the clinic with the main goal to facilitate the diagnosis to clinicians.

Translational relevance: This project will establish the proper measures to accomplish with the RRI principles promoted by the H2020 and taking in consideration the potential implications and societal expectations about the research that we are going to develop, contributing to foster the design of inclusive and sustainable R&I. Assuming that RRI implies different societal actors (researchers, patients, industry, clinicians...), we will work together during the whole innovation process to better align the possible outcomes with the values, needs and expectations of society. DrNanoDAll will establish a RRI Committee with members of its six partners that will create a RRI Plan to implement during the project and that will include an external RRI expert. Together will apply the principles of RRI by a continuous anticipation, reflexivity, inclusion and mutual responsiveness and guarding the RRI principles: Public engagement, Open access, Gender issues, Ethics and Science Education. DrNanoDAll includes a Dissemination Activities Plan elaboration and a Data Management Plan, part of the strategy for a correct Exploitation of the Results.
