

PRAGMATICA DELLA COMUNICAZIONE E COMPORTAMENTO IN SOGGETTI CON SINDROME DI WILLIAMS

DR. RENATO BORGATTI

E-MAIL: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1
Neuropatologia

Periodo di svolgimento
2009

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

RIASSUNTO

Le ricerche relative alla correlazione genotipo/fenotipo nei disordini evolutivi hanno evidenziato il contributo dei fattori genetici e neurobiologici alle variazioni dello sviluppo tipico e atipico. I disordini relativamente omogenei quali la Sindrome di Williams (WS) stanno offrendo una opportunità unica per chiarire le relazioni tra geni, cervello e comportamento; la delezione emizigote di circa 25 geni nella WS comporta infatti una cascata di conseguenze a livello fisico, cognitivo-comportamentale, affettivo e neurobiologico. Nel corso degli anni la linea di ricerca sulla WS nel nostro Istituto ha portato a diversi contributi pubblicati.

Lungo questa linea il progetto mirava ad costruire ed applicare un protocollo per lo studio del linguaggio narrativo e spontaneo, rilevando organizzazione (micro e macrolinguistica), livello di efficacia comunicativa e di elaborazione concettuale, ponendolo in relazione sia con le altre competenze (in particolare visuospatiali e visuocostruttive) che con il comportamento.

I risultati dello studio delle competenze narrative e dei suoi correlati neuropsicologici sono stati oggetto pubblicazione (Marini A. et al. Neuropsychological correlates of narrative language in Williams Syndrome. Journal of Neurolinguistics 23 (2010) 97–111). Sono state indagate competenze cognitive generali, abilità visuospatiali, attenzione sostenuta, memoria a breve fonologica e lessicale e competenze grammaticali sia nel linguaggio espressivo che ricettivo. Le competenze narrative sono state indagate con un compito di descrizione di figure, per facilitare una produzione linguistica più comunicativa e fluente. I dati raccolti suggeriscono la presenza di una difficoltà nell'estrazione di unità informative efficaci, più marcatamente quando siano implicate competenze spaziali ed esecutive. I risultati orientano alla presenza di un impairment selettivo nella WS nel dominio della processazione del discorso; il deficit specifico è più evidente quando sia richiesta una proces-

sazione ed organizzazione on line dell'informazione complessa rispetto alla semplice analisi percettiva.

La seconda fase del progetto si è focalizzata sull'analisi del profilo comportamentale nei partecipanti con SW, con attenzione alla comunicazione, ai comportamenti auto ed eterodiretti, alle componenti ansiose e alle condotte antisociali. È stato utilizzato un questionario da sottoporre ai genitori (DBC-P: Parent, Einfeld & Tonge, 1992) già usato con WS ed altre situazioni cliniche caratterizzate da Ritardo Mentale. Il progetto ha coinvolto 41 soggetti con SW con range di età fra i 5 e i 29 anni. Si sono evidenziati rilevanti problemi comportamentali (più del 65% dei partecipanti hanno superato il cutoff). Il profilo comportamentale è risultato caratterizzato da una prevalenza di comportamenti ansiosi o di esternalizzazione in assenza di condotte antisociali. Si è inoltre osservata un'importante incidenza di impulsività e instabilità comportamentale. Abbiamo riscontrato un effetto di genere: le femmine hanno meno comportamenti di interiorizzazione e quindi sono meno problematiche in generale. Similmente un livello cognitivo più alto porta i nostri partecipanti con SW a comportamenti di maggiore esternalizzazione o per lo meno ad una tendenza di minore interiorizzazione. L'analisi evolutiva dei profili comportamentali ha evidenziato che il fenotipo comportamentale nel WS non è stabile nel tempo come precedentemente descritto e soprattutto non è privo problematiche anche rilevanti. Gli elementi raccolti consentono di ampliare le conoscenze relative alla relazione tra fenotipo comportamentale (comportamento, psicopatologia) e genotipo e tra struttura e funzione. Rilevante inoltre è la ricaduta clinico/riabilitativa per la stretta connessione tra comportamento e partecipazione.

LE BASI NEUROBIOLOGICHE DELL'INTERAZIONE PRECOCE MADRE-BAMBINO: STUDIO CLINICO, NEUROCHIMICO, NEUROFISIOLOGICO E DI NEUROIMAGING FUNZIONALE

DR. ROSARIO MONTIROSSO

E-MAIL: ROSARIO.MONTIROSSO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Ospedale "A. Manzoni", Lecco

RIASSUNTO

Background

La nascita pretermine, tra le varie implicazioni, comporta l'alterazione di alcuni ritmi biologici, quali ad esempio il ciclo sonno-veglia. È stato documentato che queste modificazioni si associano a modificazioni nei ritmi sociali ed in particolare alla ridotta capacità di sincronizzazione nell'interazione precoce madre-bambino. Allo stesso tempo la nascita di un figlio pretermine determina elevati livelli di stress e depressione materna. Questa condizione emotiva non solo influenza lo scambio interattivo tra la madre e il bambino, ma secondo recenti studi effettuati su gruppi di madri depresse tramite la risonanza magnetica, trova espressione anche a livello neurocerebrale; sono stati riportati pattern di attivazione cerebrale diversi tra queste madri e quelli di madri non depresse.

Sulla base di queste evidenze la presente ricerca corrente intende investigare le basi neurobiologiche dell'interazione precoce tra madre e bambino pretermine attraverso due distinti indagini: la relazione tra ritmi biologici e ritmi sociali (Studio I) e le possibili alterazioni dei pattern cerebrali materni associati alla genitorialità nel caso di un figlio pretermine (Studio II). I due studi saranno svolti in fasi successive, pertanto la presente relazione rendiconta solo delle attività di implementazione svolte per la realizzazione dello Studio I.

Obiettivo generale

Lo scopo principale dello studio I è indagare il rapporto tra alcuni processi neurobiologici (ritmo sonno-veglia e reattività del sistema nervoso parasim-

patico) rilevabili nel bambino pretermine e qualità delle relazione primaria indagata attraverso sia parametri fisiologici (attività vagale e cortisolo salivare) che tramite l'analisi dell'interazione precoce madre-bambino.

Metodi e procedura

Il protocollo della ricerca prevede attività nel corso dell'ospedalizzazione del bambino (Fase 1), ovvero la settimana prima della dimissione e a tre mesi di vita dello stesso (Fase 2).

L'analisi dell'organizzazione dei ritmi biologici nel corso del ricovero in terapia intensiva neonatale avviene attraverso un'osservazione del ciclo sonno-veglia e la registrazione dell'attività ECG (tono vagale). L'analisi dell'organizzazione dei ritmi sociali relativi all'interazione precoce madre-bambino si effettua utilizzando il paradigma Still-Face. Nel corso di quest'ultima procedura si acquisisce anche l'attività ECG (sia dell'infante che della madre) e si effettua il prelievo di campioni di saliva per l'analisi del cortisolo (prima e dopo l'interazione diadica).

Il tono vagale cardiaco viene valutato attraverso l'Aritmia Sinusale Respiratoria, calcolata implementando l'algoritmo brevettato da Porges (1985) in un software appositamente sviluppato, che utilizza Matlab come ambiente di programmazione. Le concentrazioni di cortisolo salivare vengono quantificate secondo la metodica EIA (Enzyme Immuno Assay).

Obiettivi intermedi per l'anno 2009

Relativamente alla Fase 1 sono stati svolti diversi incontri di carattere informativo ed organizzativo con i responsabili della Struttura Complessa di Neonatologia e la Terapia Intensiva Neonatale (TIN) dell'Ospedale "A. Manzoni" di Lecco. Sono state definiti i termini della collaborazione e acquisite le autorizzazioni per l'accesso al reparto. Sono state inoltre attivate le procedure di reclutamento dei piccoli pazienti e delle loro famiglie. Seguendo la prassi richiesta dall'Ospedale "A. Manzoni" il protocollo di ricerca è stato sottoposto al Comitato Etico locale al fine di ottenere la ratifica dello stesso.

Sul piano tecnico, per poter acquisire i segnali ECG dei neonati pretermine, è stato necessario richiedere specifiche autorizzazioni e l'implementazione delle strumentazioni presenti nella TIN alla Philips Healthcare, la quale è proprietaria dei formati di esportazione dei segnali. Infine sono state effettuate registrazioni di prova relative all'analisi del ciclo sonno-veglia utili a definire operativamente le procedure del protocollo.

Per quanto riguarda la Fase 2 sono state eseguite registrazioni di prova dell'ECG del bambino e della madre nel corso dell'interazione diadica con prelievo di campioni di cortisolo, di entrambi i partner, pre e post procedura.

Attività previste per il 2010

Nel corso del 2010 è previsto il reclutamento di almeno 15 bambini pretermine e la conseguente applicazione dell'intero protocollo sia per la Fase 1 che per la Fase 2 dello Studio I. Inoltre saranno avviate le procedure di implementazione dello Studio II. In particolare saranno intraprese tutte procedure relative alla messa a punto degli stimoli da utilizzare nel corso della risonanza magnetica funzionale a cui verranno sottoposte un gruppo di madri di bambini pretermine diverso da quello che partecipata allo Studio I (cfr. protocollo RC2009).

ATASSIE CONGENITE NON EVOLUTIVE: STUDIO CLINICO, GENETICO E NEURORADIOLOGICO**DR. RENATO BORGATTI**

E-MAIL: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Reparto Neuroriabilitazione 1, Laboratorio di Citogenetica e Molecolare
Istituto C.S.S. Mendel - Roma (resp. Progetto Prof.ssa E.M. Valente)

RIASSUNTO

L'utilizzo sempre più ampio della risonanza magnetica (RMN) dell'encefalo in soggetti con problemi neurologici e la messa a punto di tecnologie sempre più avanzate, ha incrementato in modo considerevole la conoscenza dei quadri malformativi coinvolgenti il Sistema Nervoso Centrale, permettendo la messa a punto di protocolli neuroradiologici specifici. Parallelamente, uno studio sempre più dettagliato delle abilità cognitive e neuropsicologiche oltre che della descrizione di diversi fenotipi comportamentali ha portato ad una miglior comprensione della relazione sussistente tra le lesioni riscontrabili all'indagine neuroradiologica ed i profili cognitivi comportamentali osservati nei pazienti.

I progressi nel campo dell'indagine genetica consentono oggi di ritrovare sempre più frequentemente alla base dei quadri malformativi cerebrali, situazioni di sbilancio cromosomico o, più raramente, mutazioni puntiformi di singolo gene, con il risultato che la correlazione genotipo-fenotipo è sempre più frequente e precisa.

La ricerca si è proposta l'obiettivo di rivalutare un'ampia casistica di soggetti con atassia congenita non evolutiva e malformazioni cerebellari, individuati sulla base del quadro clinico e del reperto neuroradiologico, al fine di raccogliere dati preliminari relativi a: - correlazione genotipo-fenotipo; - studio del ruolo di specifici geni potenzialmente coinvolti nella eziopatogenesi di determinate malformazioni cerebellari (e quindi ruolo degli stessi geni nella morfogenesi del cervelletto e della fossa cranica posteriore); - indicazione

per stesura di possibili iter diagnostici e riabilitativi mirati e specifici per i soggetti con malformazione cerebellare.

Ogni soggetto è stato sottoposto a: un'attenta raccolta anamnestica familiare (presenza di familiari con: stesso quadro clinico, quadro plurimalformativo, poliabortività, mortalità in epoca perinatale, etc..) e gravidica (ricerca teratogeni o eventi infettivi materni), ad una valutazione clinica / dismorfologica e neuropsichiatrica, ad indagini strumentali varie (es. ecocardiogramma, ecografia addome completo, indagini radiologiche apparato scheletrico, registrazione EEG, etc..) ed altre valutazioni specialistiche (es. in ambito oculistico ed audiologico), in casi selezionati.

È stata inoltre condotta una rivalutazione delle indagini neuroradiologiche precedentemente effettuate attraverso un protocollo appositamente elaborato. Sulla base del reperto neuroradiologico riscontrato, sono state avviate indagini genetiche di II livello (analisi del genoma con la metodica SNP-array o ricerca di mutazioni in geni specifici).

Nel primo anno della ricerca sono stati arruolati 34 soggetti con atassia congenita non evolutiva che, in base al reperto neuroradiologico, sono stati suddivisi in tre sottogruppi: anomalie cerebellari primarie isolate (22 soggetti); associate ad altre anomalie sottotentoriali (un soggetto) o a malformazioni sovratentoriali (12 soggetti).

In relazione al fenotipo neuroradiologico, specifici sottogruppi di soggetti sono stati sottoposti ad analisi di mutazione in geni candidati, identificati sulla base dei dati presenti in letteratura: - malformazione di Dandy-Walker: geni ZIC 1, ZIC 4 e FOXC1; - ipoplasia cerebellare in maschi con ritardo mentale: OPHN1 e CASK; -malformazione del Dente Molare (MTS) in Joubert Syndrome and Related Disorders (JSRD): INPP5E, AHI1, NPHP1, CEP290, MKS3, RPGRIP1L, ARL13B, CC2D2A, Locus 11p12-q13.

I soggetti non appartenenti alle categorie specifiche sopraelencate o negativi all'analisi molecolare, sono stati candidati ad analisi del genoma con la metodica SNP-array Affimetrix.

Dati interessanti in ambito molecolare e citogenetico sono stati sinora:

- il riscontro di mutazione puntiforme in omozigosi (H896R) in un fratello e un sorella di 8 ½ anni e 4 ½ anni rispettivamente, con quadro di sindrome di Joubert, caratterizzato da: segno radiologico del "Dente molare" e grave ritardo neuropsichico che interessa le diverse competenze neuro e psicomotorie, cognitive e linguistiche, e neurovisive. Il fenotipo individuato è parzialmente compatibile con quanto descritto in letteratura. Infatti è assente il dato, descritto nel 12.7% dei soggetti con mutazione nota di AHI1, di associazione con anomalia di migrazione neuronale, e retinopatia (progressivo nel 21.7 % dei soggetti).

- il riscontro di riarrangiamento cromosomico (del 3q22-3q25), in una bambina di 2 anni e 2 mesi, che presenta un quadro clinico caratterizzato da ipoplasia cerebellare (prevalente a carico del verme), microcefalia, ritardo neuropsicomotorio, ipotonia muscolare generalizzata normoreflessica

SVILUPPO DEI PROCESSI DI ATTENZIONE E MEMORIA IN NEONATI SANI E NATI IN CONDIZIONI DI RISCHIO EVOLUTIVO

DR. ROSARIO MONTIROSSO

E-MAIL: ROSARIO.MONTIROSSO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1
Neuropatologia

Periodo di svolgimento
2009

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

Collaborazioni

Child Development Unit, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Reparto di Pediatria, Ospedale Sacra Famiglia, Erba, Como, Italia

RIASSUNTO

Introduzione

L'obiettivo principale di questo studio è di indagare le capacità mnestiche infantili in una situazione sociale stressante e connotata dal punto di vista emozionale (per i dettagli del protocollo vedi relazione Ricerca Corrente 2007). Lo studio valuta la reattività fisiologica, oltre che comportamentale, di bambini di quattro mesi di vita nel corso di una situazione interattiva che prevede una fase di non responsività materna (paradigma Still-Face). In particolare, sono stati analizzati due indicatori dello stress: il primo collegato alla risposta del sistema parasimpatico (tono vagale); il secondo all'attività del sistema neuroendocrino (cortisolo salivare). Nella presente relazione sono riportati i dati dei suddetti indicatori fisiologici ottenuti dalle registrazioni effettuate nel corso del 2009, che sono tuttavia presentanti in modo cumulativo con i dati ottenuti nel corso del 2008.

Strumenti e misure

Le coppie madre-bambino partecipanti allo studio sono suddivise in due gruppi: a) un gruppo sperimentale, costituito da diadi che effettuano due sessioni di Still-Face (rispettivamente a 4 mesi e 4 mesi e 15 giorni di età del bambino), e b) un gruppo di controllo, le cui diadi partecipano ad un'unica sessione corrispondente all'età di 4 mesi e 15 giorni. La risposta del bambino alla procedura Still-Face è valutata sia dal punto di vista comportamentale che in termini di reattività fisiologica. Ad oggi hanno partecipato alla ricerca

78 diadi madre-bambino, assegnate in modo casuale ai due gruppi: 38 diadi al gruppo sperimentale (gruppo A) e 40 al gruppo di controllo (gruppo B). In questo studio è stata applicata una versione modificata del paradigma Still-Face, in cui sono presenti due episodi di non-responsività materna (Haley & Stansbury, 2003). Durante la procedura di interazione madre-bambino, è stato simultaneamente acquisito l'ECG dell'infante; inoltre, prima e dopo l'applicazione del paradigma sperimentale, sono stati prelevati dei campioni di saliva del bambino. Il tono vagale cardiaco è stato valutato attraverso l'Arritmia Sinusale Respiratoria (RSA), calcolata implementando l'algoritmo brevettato da Porges (1985). Le concentrazioni di cortisolo salivare sono state quantificate secondo la metodica EIA (Enzyme Immuno Assay).

Resoconto attività 2009

Complessivamente, quest'anno sono state video-registrate le interazioni di 63 diadi (20 del gruppo A e 23 del gruppo B). In linea con le analisi preliminari condotte nel corso del 2008, i bambini sono stati suddivisi in due gruppi in funzione del tipo di risposta fisiologica del soggetto. Rispetto al tono vagale cardiaco, sono stati distinti i cosiddetti "Soppressori" (coloro che esibivano una diminuzione dell'attività vagale in risposta allo stress indotto) dai "Non-Soppressori" (che presentavano una reazione opposta). Per quanto riguarda la risposta ormonale, i bambini sono stati classificati in base al fatto che rispondessero allo stress indotto con un aumento ("Incrementatori") oppure una riduzione ("Decrementatori") della concentrazione di cortisolo salivare.

Risultati e discussione

Complessivamente, gli infanti che sperimentavano la procedura Still-Face per la prima volta (gruppo A sessione 1 e gruppo B) esibivano una reattività fisiologica analoga, sia per quanto riguarda l'andamento dell'RSA durante la procedura Still-Face, che per i valori di picco della concentrazione di cortisolo salivare post-interazione madre-bambino. Invece, i bambini che ripetevano la sessione per la seconda volta, ovvero che erano già stati precedentemente esposti ad una situazione di stress interattivo (gruppo A sessione 2), presentavano andamenti di entrambe le risposte fisiologiche differenti da quelle osservate nella sessione 1. Questa diversa reattività fisiologica potrebbe essere ricondotta ad una forma di memorizzazione della situazione socio-emozionale sviluppato da questi bambini. La presenza di due diverse modalità di reattività fisiologica dei sistemi nervoso parasimpatico e ipotalamico-pituitario-adrenocorticale potrà essere compresa meglio integrando l'analisi delle risposte comportamentali dei bambini.

Attività previste per il 2010

Nel corso del 2010 verranno ampliati ulteriormente i due campioni, in modo da bilanciare la numerosità dei due gruppi. Inoltre, al fine di analizzare la reattività fisiologica in associazione alle risposte comportamentali, nel corso della Ricerca Corrente 2010 sarà proseguita la codifica micro-analitica (secondo per secondo) dei comportamenti della madre e del bambino durante la procedura Still-Face.

LA RIABILITAZIONE VISIVA PRECOCE NEL NEONATO CON SOFFERENZA PRE-PERINATALE: STUDIO DELL'EFFICACIA DI DIFFERENTI PROTOCOLLI DI TRATTAMENTO ATTRAVERSO TECNICHE NEUROFISIOLOGICHE E DI NEUROIMAGING (PROBABILISTIC DIFFUSION TRACTOGRAPHY)

DR. RENATO BORGATTI

E-MAIL: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1
Neuropatologia

Periodo di svolgimento
2009

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

Collaborazioni
Università degli Studi di Milano – Bicocca

RIASSUNTO

Background

La funzione visiva riveste fin dalla nascita un ruolo centrale nello sviluppo neuromotorio, cognitivo ed affettivo del bambino, in quanto costituisce uno strumento privilegiato di interazione con la realtà. Un deficit in questo canale percettivo costituisce un fattore di rischio importante e per questo motivo è fondamentale diagnosticare più precocemente possibile condizione di deficit visivi. Ciò permette di intraprendere trattamenti in grado di ridurre sia le difficoltà direttamente connesse al deficit stesso sia l'interferenza che questo deficit può avere sullo sviluppo globale.

Obiettivo generale

L'obiettivo generale della ricerca corrente è quello di indagare l'efficacia di un training di stimolazione visiva, mediante la valutazione di aspetti percettivo-comportamentali e neuroradiologici, implementato per bambini ipovedenti di età inferiore ai due anni.

Obiettivi intermedi per l'anno 2009

La mancanza di precedenti studi approfonditi rispetto alle modalità di trattamento ha reso necessaria una prima fase di indagine rispetto ad alcuni aspetti critici, quali il tipo di stimolazione, le modalità di presentazione e la

fase di sviluppo più appropriate per il training. Pertanto al fine di strutturare un training adeguato di stimolazione nella prima fase della ricerca è stato messo a punto uno specifico protocollo volto ad individuare stimolazioni il più possibile efficaci per le capacità percettive di bambini con diagnosi di ipovisione. La metodologia di stimolazione utilizzata è basata sull'utilizzo del paradigma dell'abituazione visiva, una tecnica non invasiva molto utilizzata nell'ambito della psicologia dello sviluppo percettivo, che consente di avere informazioni precise circa le capacità percettive nei primi mesi di vita. Sono stati messi a punti gli stimoli di natura intersensoriale e sono state effettuate delle prove preliminari di stimolazione di 5 bambini ipovedenti per testare il setting sperimentale.

Attività previste per il 2010

Nel corso della RC 2010 prenderanno avvio le registrazioni riguardanti l'indagine della percezione intersensoriale. Gli stimoli progettati saranno proposti ad un gruppo di soggetti che non parteciperà alle successive fasi della ricerca, utilizzando il paradigma dell'abituazione visiva. Il protocollo prevede 3 sessioni sperimentali, ciascuna della durata di 10 minuti, effettuate tutte nello stesso giorno, alla distanza di circa 15 minuti l'una dall'altra. Il campione di questo studio è costituito da 3 sottogruppi, ciascuno costituito da 15 soggetti, rispettivamente composti da bambini sani e nati a termine, bambini con diagnosi di ipovisione (periferica o centrale) e bambini con ritardo psicomotorio, osservati tra i 6 e gli 8 mesi di vita.

STUDIO DI NEUROIMAGING AVANZATO (VOLUMETRIA, TRATTOGRAFIA, SPETTROSCOPIA, RMN E PET (F-FDG PET) IN SOGGETTI CON MALATTIA DEL I MOTONEURONI MOLECOLARMENTE DEFINITE

DR. ANDREA MARTINUZZI

E-MAIL: ANDREA.MARTINUZZI@CN.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS "E. Medea": U.O. Riabilitazione Funzionale di Bosisio, Laboratorio di Citogenetica e Biologia Molecolare di Bosisio, Istituto di Fisiologia Clinica CNR-CREAS, Pisa, Neuroradiologia ULSS 7 Conegliano, Neuroradiologia HSR

RIASSUNTO

La valutazione incrociata dei dati clinico-molecolari con i dati provenienti da analisi di neuroimaging avanzato rappresenta nell'area delle paraplegie spastiche ereditarie una novità assoluta. La ricerca avviata nel 2009 ha compreso per l'UO di Conegliano e Pieve di Soligo la sistematizzazione di tutti i dati clinico-funzionali con la creazione di un database dedicato, e la acquisizione di immagini in RMN encefalica (DTI tractography, spettroscopia, morfometria) per un congruo numero di soggetti con HSP associata a mutazione di SPG4 (7) e di controllo comparabili per età (12). Non sono risultati leggibili e utilizzabili le immagini ottenute dal midollo cervicale, che richiedono un diverso e più potente magnete. La ricerca proseguirà nel 2010 con il completamento delle acquisizioni programmate sia per il gruppo HSP che per il gruppo JPLS, e la analisi dei dati di imaging raccolti in incrocio con i dati clinico-funzionali.

VALUTAZIONE MEDIANTE FMR DI PAZIENTI EMIPLEGICI PRE E POST TRATTAMENTO CON CONSTRAINT THERAPY

DR.SSA ANNA CARLA TURCONI

E-MAIL: ANNACARLA.TURCONI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Polo di Conegliano Veneto e sede di Pieve di Soligo, IRCCS S. Raffaele Centro Analisi Biosegnali

RIASSUNTO

Descrizione

La penalizzazione terapeutica dell'arto conservato, chiamata constraint induced therapy (CIT), viene definita come una terapia che abbina l'allenamento intensivo di un arto superiore leso dopo danno neurologico centrale alla penalizzazione funzionale dell'uso dell'arto sano.

Gli studi pilota che dal 2000 valutano l'efficacia della CIT non dispongono di studi neurofisiologici o di neuroimaging che documentino le modificazioni indotte dalla riorganizzazione neurologica post terapia costrittiva.

Obiettivo dello studio è quello di documentare come i miglioramenti funzionali possano correlare con la riorganizzazione funzionale cerebrale. Prima del trattamento ed al termine dello stesso verrà effettuata Risonanza Magnetica Funzionale (fMR) con compito motorio passivo (chiusura e apertura mano) e a riposo e a trattografia per studio delle vie corticospinali mediante tecnica di Diffusion Tensor Imaging (DTI) per comprendere i pattern di attivazione cerebrale durante l'esecuzione di un compito specifico.

Nella sede di Bosisio Parini sono stati reclutati 6 soggetti di età compresa tra 5 e 13 anni affetti da esiti di emiplegia congenita o acquisita. Sono stati sottoposti a trattamento con constraint therapy con contenzione dell'arto sano ed allenamento intensivo dell'arto plegico secondo un programma che prevede la costrizione mantenuta 3 ore al giorno, 7 giorni la settimana, accessi alla terapia (intensiva) ai centri 3 volte la settimana per 3 ore di cui 1,30 di terapia,

1,30 di lavoro per la famiglia per un periodo complessivo della CTI: 2 mesi. Il protocollo di valutazione (T0) include: raccolta di dati anamnestici e clinici circa la compromissione motoria, esame obiettivo e neurologico completo, valutazione della stereognosi e Test della Figura Umana a partire dai 4 anni, Gross Motor Function Measure (GMFM), scala di sviluppo, Quality of Upper Extremità Skills Test (QUEST) e la scala Besta, scala di stress familiare (Parenting Stress Index) compilata da parte dei genitori e Child Behavior Checklist. Alla fine del trattamento (T1) e dopo 6 mesi (T2) il paziente sono stati nuovamente sottoposto alla stessa indagine neuroradiologica che era stata effettuata prima del trattamento e delle valutazioni funzionali sopra descritte. Nella sede di Pieve di Soligo del Polo Veneto di Conegliano, per la parte sulla popolazione infantile verranno reclutati da 2 a 6 soggetti tra i 2 e i 14 anni affetti da esiti di emiplegia dovuta danno congenito o acquisito e seguiranno gli schemi proposti per la sede di Bosisio Parini. I dati di questi soggetti integreranno quelli della sede Centrale. Per la parte sulla popolazione adulta verranno reclutati da 4 a 10 soggetti con un'età compresa tra 16 e 65 anni, un quadro di emiparesi dovuto a eventi acuti ischemici o emorragici acquisiti, oppure trauma cranico. I pazienti verranno sottoposti ad esame di fMR presso l'Ospedale di Conegliano con compito motorio attivo (apertura e chiusura di un tappo). Verranno inoltre sottoposti a potenziali evocati sensoriali (PES) e motori (PEM) presso la sede di Pieve di Soligo. I pazienti reclutati saranno quindi sottoposti a trattamento con constraint therapy. Il protocollo di valutazione (T0) include: raccolta di dati anamnestici e clinici indicanti il livello di gravità di compromissione motoria, esame obiettivo e neurologico completo, valutazione delle abilità motorie globali (test della forza, spasticità - Asworth - e esame articolare), valutazione neuropsicologica, valutazione della funzionalità dell'arto superiore (O'Connor Finger Dexterity Test, Pennsylvania Bi-Manual Worksample); valutazione delle autonomie di vita quotidiana (FIM e NIAF-R) e valutazione dello stato emotivo (CBA 2.0).

Risultati

Ad oggi (fine 2009) sono stati reclutati 9 pazienti:

- Paziente numero 1 (9 aa e 11 mesi), con diagnosi di emisindrome facio-brachio-crutale sinistra, deficit neuropsicologici, esiti di ictus ischemico emisferico destro in cardiopatia congenita, occorso in data 09/12/2007;
- Paziente numero 2 (10 aa e 11 mesi), con diagnosi di emiparesi sinistra con maggior compromissione dell'arto superiore e deficit neuropsicologici in esito di trauma cranico occorso in data 08/04/2007;
- Paziente numero 3 (12 aa e 11 mesi), con diagnosi di emisindrome moto-

ria destra, afasia non fluente in paziente affetto da ictus cerebri ischemico corticale sottocorticale e profondo fronto-temporale sinistro criptogenetico, occorso in data 5/12/2007.

- Paziente numero 4 (13 anni) lieve emisindrome destra, difficoltà neuropsicologiche e linguistiche in paziente con esiti di asportazione di angioma cavernoso fronto-temporo-parietale sinistra.
- Paziente numero 5 (11 anni): sfumata emisindrome facio-brachio-crutale destra, tremore prevalente agli arti superiori, exotropia occhio destro, deficit neuropsicologici e del linguaggio in esiti di grave trauma cranico (ottobre 2008).
- Paziente numero 6 (11 anni); stroke ischemico capsulo lenticolare sinistro, emiparesi destra, cardiomiopatia dilatativa in esito di possibile IMA o possibile miocardite. Probabile sindrome da anticorpi anti-fosfolipide in corso di accertamento.
- Paziente numero 7 (8 anni); trauma da incidente stradale con quadro di tetraparesi a maggiore compromissione sinistra, atassia, dismetria, deficit neuropsicologico e linguistico.
- Paziente numero 8 (8 anni): emisindrome sensitivo-motoria facio-brachio-crutale destra e afasia non fluente in soggetto con esiti di ictus cerebri (occorso il 5/06/2009)
- Paziente numero 9 (5 anni); parto distocico, a un mese di vita presenta grave crisi comiziale; alla RMN si documenta lesione ischemica emisferica sinistra. Emiplegia destra.

I bambini sono riusciti ad integrare l'arto superiore plegico nelle attività quotidiane e hanno anche migliorato positivamente tempi di attenzione e modalità di partecipazione alle proposte. Anche la soddisfazione delle famiglie è complessivamente positiva, pur considerando il trattamento oneroso e faticoso; per quanto riscontrato fino ad ora, i genitori si dichiarano abbastanza soddisfatti di come il bambino utilizza la mano al termine del trattamento, dell'autonomia dello stesso e delle cose che sa fare. Parere positivo anche riguardo alla variazione del comportamento del bambino e alla propria capacità di saper proporre attività utili.

Attività previste

Per l'anno 2010 verrà valutata una casistica di altri 6 pazienti di età compresa tra 5 e 14 anni affetti da esiti di emiplegia dovuta a eventi anossici-ischemici-vascolari pre-peri natali (danno congenito) o anossici-ischemici-vascolari-traumatici post-natali (danno acquisito). I pazienti verranno sottoposti ad esame di Risonanza Magnetica Funzionale (fMR) con compito motorio pas-

sivo (chiusura e apertura mano) e a riposo e a trattografia per studio delle vie corticospinali mediante tecnica di Diffusion Tensor Imaging (DTI) e valutati secondo il protocollo standard di valutazione.

RISONANZA MAGNETICA (MRI), ANGIO-RISONANZA (MRA) E DIFFUSION TENSOR IMAGING (DTI) NELLO STROKE IN ETÀ EVOLUTIVA: CORRELAZIONI CLINICO-NEURORADIOLOGICHE E VALUTAZIONE DEGLI OUT COME NEURORIABILITATIVI

DR. ANTONIO TRABACCA

E-MAIL: ANTONIO.TRABACCA@OS.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Ostuni

RIASSUNTO

Lo stroke in età evolutiva è una sindrome clinica caratterizzata dalla comparsa di segni focali o disturbi globali delle funzioni cerebrali, di durata superiore a 24 ore o a esito infausto, determinata da occlusione o rottura arteriosa o venosa. La sua incidenza in età pediatrica è valutata dell'ordine di 1/4000/anno. Un altro picco si registra nell'adolescenza, quando i fattori di rischio si diversificano da quelli delle età precedenti per avvicinarsi a quelli tipici dell'età adulta.

Lo stroke è una causa frequente di disabilità nell'infanzia e può determinare deficit neurologici persistenti (epilessia, paralisi cerebrale, disturbo del linguaggio e del comportamento e deficit cognitivi). Le conoscenze attuali sulle relazioni causali tra fattori di rischio, caratteristiche del danno cerebrale, esiti clinici e outcome sono ancora lacunose e il dato MRI e MRA rimane l'indicatore predittivo più specifico di evoluzione clinica.

Il nostro studio si propone di individuare eventuali markers predittivi di caratteristiche di funzionamento/disabilità e di outcome in soggetti con stroke pediatrico, correlando i diversi quadri clinico-neurologici con l'outcome neuroriabilitativo, e quindi di fornire conoscenze per una appropriata prevenzione dello stroke a partire da epoche molto precoci.

A tal fine sono stati arruolati bambini affetti da emiparesi esito di insulto cerebro-vascolare che sono stati sottoposti ad una accurata valutazione clinico-funzionale (in ambito motorio, cognitivo e linguistico) e all'esecuzione di MRI, MRA e DTI. Si è poi proceduto alla ricostruzione trattografica delle fibre appartenenti al tratto corticospinale.

In tutti i bambini è stata registrata una evidente riduzione del volume del

fascio considerato e del numero di fibre che lo compongono, in corrispondenza della lesione, rispetto all'emilato sano e tale riduzione è inversamente proporzionale al volume della lesione stessa.

Al contrario, la frazione anisotropica, che in corrispondenza di una lesione ischemica è per definizione aumentata, non è risultata tale in tutti i nostri pazienti.

Questo primo dato potrebbe essere interpretato come un segno di riorganizzazione cerebrale in atto.

Data la bassa numerosità del campione, i dati emersi dal presente studio devono essere considerati preliminari. I risultati ottenuti fino ad ora sono relativi alla valutazione iniziale all'arruolamento (T0); la continuazione dello studio permetterà oltre all'ampliamento del campione anche la rivalutazione dello stesso campione a distanza di 6/12 mesi dalla prima valutazione (T1) allo scopo di ottenere dati su eventuali modificazioni clinico-funzionali, potenziale espressione di neuroplasticità. La terapia riabilitativa attuale dello stroke infantile si basa su metodi operativi finalizzati all'attivazione della riorganizzazione strutturale che, soprattutto in età evolutiva, è supportata dal concetto di plasticità cerebrale.

IMPIEGO DI APPARECCHIATURE OPTOELETTRONICHE 3D PER LA VALUTAZIONE DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE NEUROMOTORIE E NEUROMUSCOLARI

DR. LUIGI PICCININI

E-MAIL: LUIGI.PICCININI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Polo di Conegliano e Pieve di Soligo
Ospedale Meyer - Firenze
Policlinico "Le Scotte" - Siena

RIASSUNTO

Sono stati valutati 3 pazienti affetti da distonia primaria geneticamente determinata (DYT +) e da distonia secondaria a sofferenza pre-perinatale, resistenti alle comuni terapie farmacologiche antidistoniche.

Dopo valutazione collegiale dei pazienti, sono state effettuate valutazioni clinico-strumentali mediante somministrazione di scale funzionali e mediante studio optoelettronico del cammino ove possibile e dell'attività manuale durante attività standardizzate.

Si è in seguito proceduto a impianto di stimolatore cerebrale profondo presso l'ospedale Meyer di Firenze. Dopo aggiustamenti dei parametri di stimolazione, in particolare ampiezza e frequenza dello stimolo, a distanza di 6 mesi sono state ripetute tutte le valutazioni eseguite a T0.

I risultati hanno dimostrato, oltre ad un miglioramento soggettivo della sintomatologia, una significativa variazione in positivo del quadro cinetico del cammino e, nei pazienti non deambulanti, nella fluidità e precisione del gesto

VALUTAZIONE DI ELEMENTI PROGNOSTICI NEL RISVEGLIO DAL COMA CON TECNICHE COMBinate DI fRMN, STUDIO POLISONNOGRAFICO E TECNICA NIRS (NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY)

DR.SSA SANDRA STRAZZER

E-MAIL: SANDRA.STRAZZER@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO

Premessa

La condizione di stato vegetativo (SV) e di Minima Coscienza (MCS) rappresentano quadri clinici poco conosciuti e molto problematici sul piano etico. La diagnosi e lo studio dello SV e MCS si basano al momento solo sulla osservazione clinica.

Obiettivo

In questo studio abbiamo voluto approfondire la fase diagnostica con indagini strumentali di imaging e di neurofisiologia clinica per chiarire le condizioni funzionali cerebrali, valutare l'integrità delle vie sensitivo-sensoriali e la presenza di eventuali processi discriminativi delle informazioni. Appare sempre più evidente che solo l'analisi comparata dei dati clinici e degli esiti degli esami strumentali è in grado di fornire elementi utili al fine di stabilire alcuni criteri prognostici/diagnostici in ordine all'evoluzione clinica di questi pazienti.

Metodi

Oltre alla valutazione clinica accurata, ripetuta, eseguita con scale appropriate, il progetto prevedeva di utilizzare la Risonanza Magnetica Cerebrale Funzionale (fRMN), la polisonnografia e la più recente tecnica funzionale fNIRS (ossia Near Infrared Reflectance Spectroscopy).

Risultati

Lo studio condotto è stato più complesso di quanto preventivato per la tipo-

logia di pazienti che richiede una selezione accurata dei casi, il superamento delle problematiche cliniche che impediscono l'accesso all'esame più invasivo costituito dalla fRM. I problemi sono stati anche di tipo organizzativo, soprattutto rispetto alla fNIRS (è stato possibile mettere a punto solo il paradigma di studio). La messa a punto del paradigma di fRM adottandolo all'età infantile e alla tipologia di pazienti ha richiesto un intenso lavoro durato quasi un anno. Dei 21 pazienti arruolati in una condizione di coma o SV l'evoluzione è stata positiva con netta uscita dallo SV di 10 pazienti, una condizione di MCS per 3 bambini, 8 permangono in una condizione di SV.

I dati emersi sia dalla polisonnografia che dalla fRM sono confortanti. Entrambi possono essere considerati più sensibili della clinica per rilevare una strutturazione neurofunzionale e di elaborazione corticale. Una maggiore attivazione funzionale corticale e il miglioramento del tracciato EEG hanno preceduto il miglioramento clinico. Il paradigma studiato si è rivelato disegnato molto bene per questa particolare età, e tipologia di paziente. Lo stimolo semplice e multiplo che prevede l'attivazione di più canali sensoriali si è dimostrato efficace. Interessante vedere che anche i pazienti che permangono in SV attivano aree corticali multiple su uno o più stimoli. Un paziente in SV discrimina in modo affettivo tra volti famigliari e non famigliari. Questo dato è di assoluto interesse in quanto prevede l'integrità di circuiti corticali complessi che dalla percezione dello stimolo visivo (aree occipitali) porta alla discriminazione e confronto (noto/non noto) e in questo caso affettive (aree frontali, cingolo, amigdala).

Conclusioni

Anche per i bambini si conferma il dato che sta emergendo per gli adulti, che a parità di condizione clinica studiata attraverso l'esame neurologico e dal punto di vista di scale appositamente disegnate, l'attivazione corticale e l'elaborazione attraverso circuiti cerebrali complessi può essere più o meno compromessa. Alcuni di questi pazienti hanno quindi un input integro o parzialmente tale a scapito di una grave compromissione dell'output, per la gravità del quadro neuromotorio.

Sicuramente un nuovo studio potrà incrementare la casistica, includere pazienti con quadro di maggiore cronicità e pazienti in SMC. Anche l'esecuzione di fNIRS, potrà evidenziare se con uno strumento più maneggevole e meno invasivo si possono avere dati che permettono di vedere l'attivazione cerebrale.

VALUTAZIONE DI ELEMENTI PROGNOSTICI NEL RISVEGLIO DAL COMA CON TECNICHE COMBinate DI FRMN, STUDIO POLISONOGRAFICO E TECNICA NIRS (NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY)

DR.SSA SARA FORTI

E-MAIL: SARA.FORTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO

Nei pazienti affetti da disturbi dello spettro autistico si sono precedentemente riscontrate alterazioni significative in diversi processi di attenzione visuo-spaziale: nello spostamento, ancoraggio e disancoraggio da stimoli visivi periferici. La funzionalità di processi può venire investigata attraverso il paradigma sperimentale noto come "gap paradigm". In esso viene misurata la facilitazione nei tempi di risposta (effetto gap) ottenuta quando tra due stimoli in successione viene inserito un intervallo temporale di 200 o 250 ms. Tale spazio vuoto infatti può facilitare il disancoraggio dal primo stimolo quindi velocizzare lo spostamento dell'attenzione sul secondo stimolo e l'ancoraggio su di esso.

L'effetto gap si verifica sia nell'orientamento attentivo automatico, misurato sulle latenze saccadiche, che nell'orientamento volontario, misurato sui tempi di risposta a stimoli visivi; nel caso di risposte volontarie l'entità della facilitazione aumenta in funzione della complessità motoria della risposta (ad es. gap maggiore in compiti di puntamento che in risposte a pulsantiera).

Nonostante le ricerche focalizzate all'analisi dei processi visuo-spaziali nell'autismo descrivano una serie di specifiche anomalie nello spostamento, ancoraggio e disancoraggio attentivo, gli studi che hanno investigato tali processi attraverso il gap paradigm riportano risultati più controversi. Nell'orientamento automatico dell'attenzione la registrazione dei movimenti oculari (Goldberg et al., 2002) ha riportato effetti gap di entità simile a quelli riscontrati in individui a sviluppo tipico, mentre studi EEG e EOG (Kawakubo et al., 2007; Van der Geest et al., 2001) hanno riportato sia entità minore che maggiore rispetto alla norma. Per quello che riguarda risposte volontarie in

un compito a tastiera, bambini con autismo hanno riportato effetti gap simili a un gruppo di bambini a sviluppo tipico appaiati per età (Todd et al., 2009). Nel nostro studio abbiamo investigato 14 bambini affetti da disturbi dello spettro autistico, a confronto con un gruppo di controllo di pari genere ed età e un gruppo di controllo di pari genere e sviluppo mentale. È stato replicato lo studio dell'effetto gap per le risposte di orientamento automatico attraverso registrazione dei movimenti oculari. Inoltre abbiamo investigato l'effetto gap per l'orientamento volontario nella stessa popolazione di bambini, manipolando la complessità motoria della risposta associata (pulsantiera vs. puntamento a touch screen). Ciò ci ha permesso di investigare direttamente la capacità di coordinazione occhio-mano in bambini con autismo, che potrebbero indicare un malfunzionamento (Glazebrook et al., 2009), a seguito di difetti di integrazione corticale (Belmonte et al., 2004).

Nell'orientamento automatico è stato riportato un effetto gap in tutti i compiti. Soprattutto, abbiamo dimostrato che anche anche l'entità della facilitazione sui movimenti oculari aumenta in funzione della complessità motoria della risposta associata (ad es. gap maggiore in compiti di puntamento che in risposte a pulsantiera). Tuttavia, non è emersa alcuna differenza tra i gruppi. Contrariamente alle nostre aspettative, non è stato registrato alcun effetto gap nei tempi di risposta volontari, né nel compito a pulsantiera, né nel compito di puntamento.

Il risultato più significativo è emerso quando i tempi di latenza saccadici sono stati messi in correlazione con i tempi di risposta manuali: sebbene i bambini a sviluppo tipico abbiano registrato una forte correlazione tra i tempi di orientamento saccadici e la velocità sia nella preparazione (RT) che nell'esecuzione della risposta di puntamento, tale correlazione non è emersa nel gruppo con disturbi dello spettro autistico.

I SUBSTRATI MORFOFUNZIONALI E GENETICI DELLE PRE-PSICOSI: UNO STUDIO MULTIMODALE CON RISONANZA MAGNETICA

DR. PAOLO BRAMBILLA

E-MAIL: PAOLO.BRAMBILLA@UNIUD.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato

RIASSUNTO

È stato definito nel corso del 2009 il paradigma sperimentale di Neuroimmagine Funzionale a cui verranno sottoposti i soggetti. Allo scopo di selezionare i 50 verbi da inserire nel compito, è stato costruito un questionario di taratura per diverse variabili psicolinguistiche che è stato somministrato a circa 550 studenti tra gli 8 e i 18 anni, reclutati presso istituti scolastici del Friuli. Le risposte ai questionari sono stati inseriti in un database da cui verranno scelti i verbi da presentare ai soggetti.

Relativamente alla raccolta dati retrospettiva dopo una prima visione delle cartelle degli istituti di Pasian di Prato e di Bosisio Parini, è stata preparata una griglia con tutte le informazioni cliniche e sociodemografiche da recuperare durante la consultazione delle cartelle cliniche in archivio dal 2003 al 2008. Il campione totale che rispettava i criteri di inclusione/esclusione a Bosisio Parini è stato pari a circa 380 soggetti e di 674 soggetti a Pasian di Prato. È stato poi creato un database informatico in cui sono stati inseriti i dati raccolti in entrambe le sedi. A fine 2009 è stato possibile effettuare delle analisi preliminari sul campione inserito fino a quel momento in database (n=808). I dati sono stati presentati in due conferenze: (1) AIPP (Associazione Italiana Prevenzione Psicosi), Genova, 26-27 novembre e (2) Convegno: Disturbo Bipolare: su e giù dal treno delle emozioni, Udine, 4 dicembre.

Le analisi hanno rivelato una predominanza di soggetti maschili nel campione (75%). Inoltre, le diagnosi più frequenti nel campione sono quelle di disturbi emozionali (40%) e di ADHD (21%). È stata effettuata anche una prima analisi esplorativa sui risultati delle scale CBCL che ha rivelato la presenza di elevati punteggi alla scala internalizzante nel gruppo di bambini con disturbi di tipo emotivo, mentre i bambini con disturbi di condotta e ADHD mostrano punteggi più elevati alla scala esternalizzante.

Inoltre, abbiamo definito la fase di reclutamento e richiamo dei soggetti inclusi nella fase retrospettiva. Essa prevede la compilazione da parte del bambino/ragazzo di alcuni questionari di approfondimento dei sintomi emotivo-comportamentali, una batteria di questionari per i sintomi di psicosi e un'intervista strutturata per una diagnosi DSM-IV o ICD-10. Inoltre al genitore che accompagna il bambino/ragazzo verrà chiesto di compilare alcuni questionari inerenti i problemi emotivo-comportamentali del figlio, un questionario sul suo comportamento e su quello del pater/coniuge e una scheda per raccogliere delle informazioni sociodemografiche.

Nel 2010 è prevista analisi completa dei dati inseriti nel database inerenti la prima fase di raccolta dati retrospettiva e rivalutazione dei bambini identificati. Ci sarà l'estensione del protocollo di valutazione retrospettiva ai Poli di San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato, Conegliano e Pasian di Prato, e Ostuni e verrà effettuato lo studio pilota comportamentale e funzionale del paradigma emotivo.

RUOLO DELLA SIMULAZIONE MENTALE DURANTE L'ELABORAZIONE LINGUISTICA

DR.SSA BARBARA TOMASINO

E-MAIL: BTOMASINO@UD.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasiand di Prato

RIASSUNTO

L'elaborazione di frasi, parole di azione o verbi che descrivono un movimento attiva, oltre alle "classiche" aree linguistiche, anche le aree motorie (e.g., Hauk et al., 2004; Tettamanti et al., 2005; Buccino et al., 2005; Oliveri et al., 2004; Tomasino et al., 2007). In particolare, il ruolo della corteccia motoria primaria (M1) in compiti linguistici rimane controverso. L'ipotesi del presente progetto di ricerca propone invece, che elaborando frasi o verbi che descrivono un movimento, i soggetti, sebbene non siano esplicitamente istruiti a immaginare mentalmente il contenuto della frase, automaticamente immaginino sé stessi o qualcun altro eseguire il movimento descritto (e.g., leggo "correre" e immagino me stesso correre, es. Tomasino et al., 2007; Tomasino et al., 2008). Una migliore comprensione dei meccanismi neurali sottostanti alla simulazione mentale durante l'elaborazione linguistica è fondamentale per la comprensione del ruolo che la teoria "embodied cognition" può giocare durante la comprensione linguistica, teoria che propone che possiamo capire le azioni dei nostri conspecifici attraverso il meccanismo dei neuroni a specchio. In questo contesto il progetto ambisce a comprendere il potere della simulazione mentale visiva e motoria.

In attesa di implementare gli esperimenti in Risonanza Magnetica funzionale, il progetto comprende studi di pazienti neurochirurgici (adulti e bambini) disegnati in modo tale da fornire delle misure in grado di evidenziare differenze funzionali tra l'esecuzione di simulazione mentale e l'esecuzione di compiti secondari non-motori durante o successivamente alla lettura e comprensione di parole che descrivono movimento. I risultati degli studi pianificati potranno fornire indicazioni utili per la comprensione e l'intervento riabilitativo dei disturbi dello sviluppo e dei disturbi linguistici in pazienti cerebrolesi.

RUOLO DELLE COMPONENTI MOTORIE E SOMATICHE NELLA RIABILITAZIONE MOTORIA E ATTRAVERSO IMMAGINAZIONE MOTORIA: STUDI MEDIANTE TMS IN SOGGETTI SANI E IN PAZIENTI CEREBROLES

DR. COSIMO URGESI

E-MAIL: COSIMO.URGESI@UNIUD.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasiand di Prato

RIASSUNTO

Il presente studio si proponeva di indagare, mediante l'uso della TMS, il possibile ruolo della componente somatica durante compiti di immaginazione motoria in prima e in terza persona, al fine di individuare possibili strategie per l'attivazione del sistema motorio, diversificate a seconda della sede lesionale (corteccia somato-sensoriale o corteccia motoria primaria). Nel corso della prima fase della ricerca si è indagato il ruolo del sistema motorio nella simulazione anticipatoria delle azioni, dimostrando come l'attivazione del sistema motorio sia specificatamente legata alla simulazione interna delle fasi future delle azioni, fornendo un modello predittivo ai sistemi percettivi. Nella seconda parte si è studiato specificatamente l'effetto della stimolazione di S1 e M1 sulla facilitazione motoria durante immaginazione. I risultati hanno mostrato come la stimolazione di S1 riducesse la facilitazione motoria durante immaginazione visiva. Al contrario, la stimolazione di M1 riduceva la facilitazione motoria durante entrambe le strategie di immaginazione. I risultati suggeriscono quindi un ruolo complementare delle componenti motorie e somatiche nella simulazione motoria.

ADATTAMENTO ALLA STANDARDIZZAZIONE DELLA BATTERIA PER LA VALUTAZIONE DEL LINGUAGGIO IN BAMBINI DAI 4 AI 12 ANNI

DR. ANDREA MARINI

E-MAIL: ANDREA.MARINI@UNIUD.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato

RIASSUNTO

Nel 2009 ha avuto inizio il processo di ideazione e standardizzazione di una "Batteria per la valutazione delle abilità linguistiche in bambini dai 4 ai 12 anni", della durata di 3 anni. La ricerca prevede una serie di fasi: 1. ideazione della Batteria e stesura delle istruzioni per la sua somministrazione; 2. studio pilota per valutare l'efficacia dei test; 3. Standardizzazione; 4. Analisi dei dati; 5. Valutazione dell'efficacia della Batteria. Nel corso del primo anno di questa ricerca si è proceduto al completamento delle prime due fasi. Nello specifico, sono stati progettati e realizzati una serie di test in grado di valutare in bambini di età compresa tra i 4 e i 12 anni le competenze fonologiche, lessicali, grammaticali, semantiche, pragmatiche e discorsive in compiti di produzione, comprensione e ripetizione orale. Per alcuni di questi test (test di denominazione e articolazione, il test di denominazione, il test di descrizione di scene singole e vignette oltre ai test di comprensione semantico-lessicale e morfosintattica) si è inoltre proceduto all'ideazione delle figure stimolo. Per il test che valuta la comprensione della prosodia linguistica emotiva sono stati registrati stimoli uditivi. Dopo aver valutato l'efficacia dei test e la loro conseguente modificazione, si è infine proceduto a reclutare gruppi di ricerca sparsi sul territorio nazionale per avere la possibilità di somministrare la Batteria al più ampio numero possibile di bambini in quattro quadranti: nord-est, nord-ovest, centro, sud e isole.

EVOLUZIONE A MEDIO-LUNGO TERMINE DEL MALTRATTAMENTO INFANTILE: CORRELAZIONI FRA FATTORI DI RISCHIO E DI PROTEZIONE COGNITIVI, RELAZIONALI, SOCIALI E GENETICI

DR.SSA RITA GALLUZZI

E-MAIL: RITA.GALLUZZI@OS.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

Ostuni

RIASSUNTO

L'idea progettuale, partendo da dati di tipo esperienziale e teorico, si pone quale contributo alle conoscenze inerenti l'outcome neuropsichico di soggetti reduci da esperienze di maltrattamento/abuso/trascuratezza. Ciò per una migliore comprensione dei processi attraverso i quali fattori di rischio ambientali ed individuali conducono allo sviluppo di problematiche psicopatologiche, ovvero svolgono funzione protettiva, e con l'intento ultimo di poter precocemente riconoscere soggetti e contesti a maggiore rischio evolutivo, aprendo la strada ad interventi di prevenzione, monitoraggio e cura. Sono stati complessivamente reclutati 63 soggetti, 36 maschi e 27 femmine, di età compresa fra 14 e 18 anni (+/- 6 mesi), per il 63,5% tuttora residenti in comunità, nel restante 36,5% in stato di affido o adozione. Nella selezione del campione, si è fatto riferimento ai seguenti criteri di inclusione:

- anamnesi positiva per esperienze di maltrattamento/abuso/trascuratezza in età infantile
- età adolescenziale-giovanile
- anamnesi negativa per chiara patologia genetica o di origine pre-perinatale
- livello cognitivo non inferiore ai limiti previsti per il lieve ritardo mentale.
- Il protocollo applicato ha previsto:
- la ricostruzione del background socio-familiare, dell'esperienza di abuso e del percorso sociale individuale (istituzionalizzazione, affido/adozione, ecc)
- la definizione del profilo comportamentale

- la diagnosi di personalità (in 61 soggetti)
- l'analisi del profilo cognitivo
- la definizione dello stile di attaccamento
- a tipizzazione per alcuni polimorfismi genici riconosciuti come associati a psicopatologia (in 53 soggetti).

La valutazione del background socio-familiare ha confermato che talune caratteristiche ambientali, inerenti ad es. lo stato abitativo ed economico, la condizione lavorativa, il livello culturale, la struttura familiare, la presenza di problematiche socio-sanitarie, costituiscono situazioni ad elevato rischio di perpetrazione di abuso all'infanzia. Dato questo che sottolinea come ancora vi sia necessità di interventi preventivi di carattere socio-assistenziale, e dunque legislativo, in grado di agire a monte su tali realtà.

Sebbene nel nostro campione (come in studi precedenti relativi alla realtà italiana) la tipologia di abuso prevalente sia rappresentata dalla grave trascuratezza (ritenuta da molti una forma "minore"), la definizione del profilo comportamentale attesta che un numero non trascurabile di ragazzi manifesta comportamenti problematici di tipo prevalentemente esternalizzato. L'analisi statistica sembra suggerire che i soggetti maggiormente a rischio sono maschi di età inferiore ai 16 anni, con quoziente intellettivo borderline o deficitario, provenienti da nuclei familiari anomali, esposti ad esperienze più gravi e/o protratte e/o precoci, con un percorso sociale più travagliato (es. istituzionalizzazione più tardiva e troppo breve o troppo lunga, esperienze di affido fallimentari).

La diagnosi di personalità conferma la ricorrenza nel campione di tratti disfunzionali, che, anzi, in sede di autovalutazione sembrano emergere in termini ancora più patologici. L'analisi statistica sembra suggerire che sono più a rischio di sviluppare una personalità disturbata le femmine di età superiore a 16 anni, di livello intellettivo deficitario, con attaccamento insicuro, provenienti da nuclei familiari di basso livello culturale e/o con problematiche psicopatologiche, esposte ad esperienze di abuso più gravi e/o protratte e/o precoci, con un percorso sociale più travagliato (es. istituzionalizzazione più tardiva e troppo breve o troppo lunga, esperienze di affido fallimentari).

Viene complessivamente a delinearsi, dunque, uno scenario di significativa problematicità, che è possibile riferire a diverse entità nosografiche (ansia, depressione, aggressività, disturbi di personalità, dipendenza,...) e che sottolinea, ancora una volta, la varietà dei potenziali effetti psicopatologici a distanza correlati con l'esperienza di abuso in età infantile.

Per quanto concerne, infine, l'indagine genetica, è interessante rilevare che nessuno dei polimorfismi in esame (isolato o in combinazione), posto in relazione statistica con il profilo comportamentale e di personalità, è risultato

rivestire valore di fattore di rischio per lo sviluppo di caratteristiche di funzionamento anomale. Si osserva, invece, un elevato numero di correlazioni laddove il patrimonio genetico e i fattori relativi al background socio-familiare, all'esperienza di abuso ed al percorso di intervento sociale vengano considerati nell'ambito di analisi di covarianza, ponendo ancora una volta l'accento sui complicati meccanismi di interazione fra geni ed ambiente che intervengono nella genesi dei quadri psicopatologici.

Ci sembra pertinente concludere condividendo l'opinione di quanti ritengono che l'abuso infantile è certamente responsabile di un danno individuale immediato e di effetti a distanza tali da determinare un impegno massivo e prolungato di diverse tipologie professionali, dimostrando di costituire una problematica sanitaria prima che sociale.

È, dunque, necessario pianificare azioni sinergiche fra i diversi enti coinvolti, mirate al contenimento del rischio ambientale, al precoce riconoscimento, alla messa in atto di interventi razionali e tarati sui bisogni individuali, al follow-up ed al tempestivo intervento terapeutico.

ASPETTI EMBODIED NEL LINGUAGGIO DEI BAMBINI CON SINDROME AUTISTICA

DR.SSA MARIALUISA LORUSSO

E-MAIL: MARIALUISA.LORUSSO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO

Introduzione

Secondo la teoria dell'embodiment (Barsalou, 1999; Gibbs, 2006), la conoscenza astratta sembra essere basata su domini concreti, formati tramite l'esperienza motoria messa in atto nell'ambiente esterno. Dagli studi in letteratura emerge come i bambini con disturbi dello spettro autistico abbiano delle difficoltà a livello dello sviluppo del linguaggio astratto (Tager-Flusberg & Joseph, 2003). Dato che in questi bambini sono stati frequentemente riscontrati anche dei problemi a livello di programmazione motoria e di integrazione sensoriale (Rinehart, Bellgrove, Tonge, Brereton, Howells-Rankin & Bradshaw, 2006; Vanvuchelen, Roeyers & De Weerd, 2007), è possibile ipotizzare che la relazione fra tali difficoltà ed i problemi nello sviluppo del linguaggio astratto possano essere spiegati sulla base della teoria dell'embodiment. È cioè possibile che i problemi sensomotori dei bambini con disturbi dello spettro autistico si ripercuotano sui processi di embodiment, rendendo più complesso il compito di acquisizione dei concetti astratti, rispetto a quanto si verifica nei bambini con sviluppo tipico.

Lo scopo principale del presente studio è quello di indagare l'attivazione di processi embodied da parte dei bambini con disturbi dello spettro autistico, analizzando l'esistenza di relazioni fra le abilità linguistiche, in modo particolare quelle legate al linguaggio astratto, e le capacità sensomotorie all'interno di questa popolazione.

Metodologia

Partecipanti

Hanno preso parte alla prima fase del progetto 13 ragazzi maschi con auti-

simo ad alto funzionamento ($n = 4$) o con sindrome di Asperger ($n = 9$), selezionati sulla base di diagnosi di disturbo pervasivo dello sviluppo e quoziente intellettivo nei limiti della norma (QIT: $M = 100$; $ds = 13$; Range = 79-123), di età cronologica compresa fra i 10 ed i 17 anni ($M = 14$).

Sono stati, inoltre, selezionati 8 ragazzi maschi con sviluppo tipico, per appaiare 8 dei ragazzi del gruppo di partecipanti con autismo [AUT]; i criteri di inclusione nel gruppo di controllo [CTR] sono stati: l'assenza di segnalazione per disturbi o ritardi evolutivi e una età cronologica pari a quella dei ragazzi inseriti nel gruppo AUT ($M = 13$; Range = 10;02-16;03).

Materiale e test per la valutazione

Per quanto riguarda lo sviluppo sensomotorio, sono state proposte prove di Stereognosi e di Cinestesia, e due subtest tratti dalla batteria NEPSY (Korkman, Kirk & Kemp, 1997): il subtest di Imitazione della posizione delle mani, e il subtest Sequenze motorie manuali.

L'abilità nel movimento fine è indagata con una prova dalla batteria Movement ABC (Henderson & Sugden, 1992), e le abilità grafomotorie utilizzando il test Visual Motor Integration (VMI).

Per quanto riguarda lo sviluppo linguistico, sono previste due prove di conoscenza lessicale e semantica (Definizioni e Odd-One-Out) e una prova di morfosintassi (Test di ripetizione di frasi, tratto dalla batteria 4-12 di Fabbro). Per quanto riguarda la valutazione dei processi di embodiment, la prova "Letterale-Figurato" valuta la capacità di giudicare, dal punto di vista semantico, la correttezza di frasi letterali (ad esempio, "preparare un caffè") e di frasi figurate (ad esempio, "preparare un piano"), ipotizzando che nella comprensione del linguaggio figurato sia presente una componente dei processi di embodiment.

La prova "Spazio-Tempo" è stata realizzata allo scopo di verificare l'esistenza di processi di embodiment nella comprensione delle preposizioni spaziali utilizzate con accezione temporale. Infine, la prova del "Salto", ha lo scopo di verificare l'esistenza di una associazione, che si ipotizza acquisita tramite processi di embodiment, fra una parola ed una componente motoria (direzionalità verso l'alto o verso il basso).

Risultati e prodotti conseguiti

I dati raccolti finora hanno evidenziato un profilo funzionale della popolazione autistica ad alto funzionamento che non rispecchia in modo fedele le descrizioni solitamente presentate per i soggetti con DGS.

In particolare, non sono emerse significative difficoltà né nella definizione e nel processamento di termini astratti, né nelle abilità visuospatiali indagate

(prassico-costruttive, grafiche, fino-motorie, cenestesiche, di stereognosi). Le uniche differenze osservabili sono di tipo qualitativo, sul tipo di risposte verbali fornite, di vocabolario ed esempi utilizzati, di atteggiamento rispetto ai compiti e alle richieste. Inoltre, i pattern di correlazioni tra abilità linguistiche e visuospatiali differiscono tra i due gruppi.

In modo particolare, è evidente come alcune delle abilità sensomotorie (stereognosi e cinestesia) risultano essere legate ai processi di embodiment solamente nei bambini del gruppo di controllo, mentre nei partecipanti del gruppo con autismo emerge un'unica relazione dello sviluppo motorio con le prove sperimentali somministrate, ma relativamente agli aspetti concreti e non a quelli astratti (Movimento fine – "Letterale-Figurato concreto").

Discussione e conclusioni

A partire da questi dati preliminari, dunque, appare plausibile che i soggetti con autismo ad alto funzionamento si caratterizzino nelle loro competenze relative alle conoscenze e al ragionamento astratto non tanto per deficit di tipo quantitativo, bensì per l'attivazione di meccanismi diversi da quelli utilizzati dai soggetti di controllo, ma altrettanto efficaci nell'ottenimento dei risultati richiesti.

Da un esperimento pilota condotto nella prima fase dello studio, tuttavia, sono emerse indicazioni suggestive di una specifica difficoltà in compiti di apprendimento di nuovi concetti astratti tramite esempi positivi e negativi, presentati in modalità verbale o visiva.

Appare pertanto possibile ipotizzare che l'uso di compiti non familiari e il riferimento a conoscenze nuove permetta di evidenziare percorsi di apprendimento diversi e meno efficienti nei bambini con sindrome autistica, che pur consentono loro nel tempo di raggiungere competenze quantitativamente non dissimili da quelle dei soggetti di controllo.

Si prevede quindi, per la prosecuzione del progetto, di integrare il protocollo di valutazione con un test sull'acquisizione di nuovi concetti astratti, abbassando ulteriormente l'età dei soggetti e i cut-off di QI per ovviare al problema degli effetti-soffitto evidenziati nella prima fase.

Riferimenti bibliografici

Barsalou, L. W. (1999). Perceptual symbol systems. *Behavioral and Brain Sciences*, 22, 577-660.

Rinehart, N. J., Bellgrove, M. A., Tonge, B. J., Brereton, A. V., Howells-Rankin, D., & Bradshaw, J. L. (2006). An Examination of Movement Kinematics in Young People with High-functioning Autism and Asperger's Disorder: Further

Evidence for a Motor Planning Deficit. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 36, 757-767.

Tager-Flusberg, H., & Joseph, R. M. (2003). Identifying neurocognitive phenotypes in autism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*, 358, 303-314.

Vanvuchelen, M., Roeyers, H., & De Weerd, W. (2007). Nature of motor imitation problems in school-aged boys with autism: A motor or a cognitive problem? *Autism*, 11(3), 225-240.

DISLESSIA EVOLUTIVA: RUOLO DEL SISTEMA MAGNOCELLULARE-DORSALE, DEL SISTEMA ATTENTIVO-PARIETALE E DEL CERVELLETTO

DR.SSA CLAUDIA CORDARO

E-MAIL: CLAUDIA@PP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato

RIASSUNTO

La dislessia evolutiva (DE) è definita come un disturbo specifico di lettura in presenza di un adeguato livello intellettivo e di adeguate opportunità di apprendimento, e in assenza di deficit sensoriali. Sebbene la dislessia evolutiva sia frequentemente associata ad un deficit linguistico-fonologico, l'eziologia sottostante rimane sconosciuta. Una ipotesi suggerisce uno specifico deficit nel sistema magnocellulare, che presiede all'elaborazione della posizione spaziale e del movimento degli stimoli sia visivi che uditivi. La via M visiva proietta al sistema Dorsale che termina nella corteccia parietale posteriore. Quest'ultima presiede all'orientamento dell'attenzione visiva che risulta indispensabile per "isolare" visivamente i grafemi che devono poi essere convertiti nei corrispettivi fonemi. Quindi la via M potrebbe essere alla base dei deficit neurocognitivi che ostacolerebbero il normale sviluppo della lettura. Allo scopo di chiarire la complessa eziopatogenesi della DE, il presente lavoro di ricerca ha lo scopo di indagare nei bambini dislessici, le funzioni cognitive legate al sistema M mediante l'uso di quattro specifici paradigmi sperimentali: test di orientamento implicito dell'attenzione visiva per valutare il decorso temporale dell'attenzione visiva spaziale, test del movimento apparente, e due perimetrie ("Frequency Doubling Perimetry-Matrix" High-Pass Resolution Perimetry) per valutare sia la via Magnocellulare che la via Parvocellulare. Il campione esaminato è composto da un gruppo di 14 bambini dislessici di classe scolastica compresa tra la III elementare e la III media, reclutati presso il reparto di neuropsichiatria infantile del centro "La Nostra Famiglia" di Pasian di Prato (Ud) e un gruppo di 17 bambini normolettori selezionati presso il reparto di oculistica del medesimo Centro. È stata eseguita una prima analisi relativa alle abilità cognitive che ha rilevato delle

differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda gli indici di lettura del testo (accuratezza e rapidità) e i punteggi relativi ai subtest della Wisc-r Somiglianze e Vocabolario. Per quanto riguarda il subtest Disegno con cubi non è stata rilevata una differenza significativa tra i valori medi, confermando i dati presenti in letteratura che non evidenziano deficit visuo-costruttivi nei bambini con DE. Dalle analisi multivariate effettuate è emersa una differenza significativa tra dislessici fonologi rispetto ai non fonologici e ai controlli al test di percezione del movimento. Questo significa che aumentando la difficoltà nel test di percezione del movimento, ovvero aumentando il rumore, si abbassa la media delle risposte corrette. Ciò risulta significativamente evidente nei bambini con dislessia fonologica rispetto ai bimbi con dislessia non fonologica e ai controlli. Dall'analisi delle soglie al FDT (via M) emerge che i non fonologici hanno una soglia più bassa in zona periferica rispetto ai controlli. Mentre non vi sono differenze nella stessa zona fra fonologici e controlli. Infine per quanto riguarda la via P, elicitata attraverso il perimetro Ring, non emerge alcuna differenza tra i gruppi.

EFFETTI PLEIOTROPICI DEI GENI DEL NEUROSVILUPPO SULLE FUNZIONI COGNITIVE IN UN'OTTICA DI INTERAZIONE GENE AMBIENTE

DR.SSA CECILIA MARINO

E-MAIL: CECILIA.MARINO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO

La ricerca corrente 2009 «Effetti pleiotropici di geni del neurosviluppo sulle disfunzioni cognitive mediante un approccio di interazione gene-ambiente», coordinata dalla dott.ssa Cecilia Marino, si è posta come obiettivi principali quelli di indagare la possibile presenza di affetti pleiotropici di geni/aree di linkage di suscettibilità per malattie complesse quali la schizofrenia, il disturbo bipolare e la Dislessia Evolutiva, e di approfondire il complesso rapporto tra fattori di rischio ambientali e genetici nel determinare la vulnerabilità a sviluppare disturbi cognitivi in età evolutiva.

All'interno di questo quadro si sono svolte principalmente analisi di associazione genetica all'interno di famiglie nucleari reclutate per avere almeno un soggetto affetto da Dislessia Evolutiva e analisi di interazione gene-ambiente. I risultati degli studi di analisi di associazione genetica hanno fornito dati che contribuiscono al chiarimento delle basi eziologiche e della complessità fenotipica della Dislessia Evolutiva, e sembrano indicare che i geni candidati per la Dislessia Evolutiva svolgono un effetto pleiotropico nel determinare, almeno in parte, l'eziologia di altre disabilità cognitive ad essa connesse.

Le analisi di interazione gene-ambiente, inoltre, hanno apportato un contributo altamente innovativo nello studio della Dislessia Evolutiva. I risultati hanno permesso di contribuire al dibattito inerente le basi eziologiche della patologia mostrando come esista un'interazione significativa tra i geni candidati per la Dislessia Evolutiva e alcune variabili ambientali.

IL RUOLO DEL CORPO CALLOSO NELLA DISLESSIA EVOLUTIVA: EVIDENZE NEUROFISIOLOGICHE, DI NEUROIMMAGINE E GENETICHE

DR. ANDREA FACOETTI

E-MAIL: ANDREA.FACOETTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO

Sebbene, in aggiunta alle tradizionali ipotesi di un disturbo linguistico-fonologico delle aree peri-silviane sinistre, siano state recentemente sviluppate ipotesi visuo-percettive ed attenzionali della dislessia evolutiva delle aree temporo-parietali destre, resta difficile da spiegare come il livello cognitivo possa mantenersi comunque nella norma anche quando sono presenti difficoltà di tipo linguistico e visuo-percettivo, ritenendo importante i fattori biologici alla base della DE. Una interessante ipotesi suggerisce che una disfunzione delle aree posteriori responsabili della lettura possa influenzare l'integrazione delle informazioni visive-ortografiche con quelle uditive-fonologiche alla base del normale sviluppo della lettura. Tale ipotesi risulta essere compatibile con le nostre numerose evidenze di un disturbo visivo e uditivo dell'attenzione spaziale nella DE in cui viene richiesto di integrare le informazioni di un emisfero con quelle dell'altro emisfero. Un disturbo funzionale della comunicazione inter-emisferica (i.e., "balance model") viene suggerita come la base teorica più promettente del trattamento riabilitativo di Bakker che ha permesso di migliorare le abilità di decodifica dei bambini con DE (Facoetti et al., 2003; Lorusso et al., 2006).

Il nostro progetto si propone di studiare gli effetti comportamentali e neurobiologici del trattamento Bakker sulle capacità visuo-percettive e delle prove di lettura in un gruppo di bambini che abbiano ricevuto diagnosi di DE e che non abbiano intrapreso già un eventuale percorso riabilitativo.

Attraverso un compito di riconoscimento di una lettera presentata all'interno di una stringa di consonanti, abbiamo simulato il processo percettivo-attenzionale richiesto dal meccanismo di segregazione grafemica necessario per leggere.

I risultati hanno evidenziato un miglioramento nella distribuzione dell'attenzione spaziale (AS) nel gruppo dei dislessici specificamente nella condizione di pre-orientamento dell'attenzione. L'effetto di orientamento dell'AS era massimizzato dopo il trattamento. Inoltre, se prima del trattamento emergeva un'asimmetrica distribuzione dell'AS nell'emicampo visivo destro, coerentemente con l'ipotesi di una "iperdistraibilità a destra" o di una "inattenzione a sinistra", questa era minimizzata dopo il trattamento.

Nel presente studio, forniamo evidenze a favore dell'ipotesi secondo cui riabilitando la disfunzione della comunicazione inter-emisferica ("balance model"; Bakker, 1992) si contribuisce a migliorare anche la funzionalità delle aree visuo-ortografiche occipito-temporali sinistre, nelle quali è implicato un processo di integrazione delle informazioni di un emisfero con quelle dell'altro emisfero e sulle quali agisce l'AS.

FATTORI GENETICI ED AMBIENTALI PREDITTIVI DELLA RISPOSTA FISIOLÓGICA ALLO STRESS. UNO STUDIO FOLLOW-UP

DR.SSA ALESSANDRA FRIGERIO

E-MAIL: ALESSANDRA.FRIGERIO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

Bosio Parini

RIASSUNTO

La comprensione dei fattori che entrano in gioco, sin dai primi anni di vita, nella capacità dell'organismo di reagire allo stress è molto importante, considerati gli effetti negativi che lo stress esercita sulla salute fisica e mentale dell'individuo. Il presente studio di follow-up si prefigge l'obiettivo di investigare il ruolo giocato dai fattori ambientali (relazione di attaccamento madre-bambino) e costituzionali (temperamento e predisposizione genetica) nella risposta psicofisiologica allo stress, misurata attraverso 4 differenti indicatori (cortisolo salivare, alpha amylase salivare, frequenza cardiaca e aritmia sino-respiratoria), in un campione di bambini testati a 1 e a 5 anni di età.

Nel corso di quest'anno è stato effettuato uno studio pilota che ci ha consentito di sperimentare il protocollo su una decina di soggetti e abbiamo iniziato la fase di re-test di una parte del campione. I dati preliminari raccolti finora, su 37 coppie madre-bambino, indicano:

- 1) una maggiore attivazione di alcuni parametri psicofisiologici (frequenza cardiaca e RSA) e non di altri (cortisolo e alpha amylase) in risposta alla procedura stressante (Cassidy e Marvin, 1992);
- 2) la mancata influenza di fattori situazionali (legati ad esempio al sonno, all'alimentazione, all'assunzione di medicinali etc) sulla risposta dei 4 markers, ad eccezione di alcuni fattori legati al tempo della valutazione che sembrano influire sui livelli di cortisolo salivare,
- 3) un'associazione tra il tratto temperamentale della timidezza e la risposta di alcuni markers (cortisolo e frequenza cardiaca) allo stress della separazione dalla madre,
- 4) alcune correlazioni significative tra la presenza di problemi comportamentali, in particolare di tipo internalizzato, e i valori dei due parametri dell'attività cardiaca (FC e RSA) misurati durante la procedura stressante.

Sebbene i dati raccolti finora sembrano indicare un maggiore coinvolgimento del sistema vagale di fronte a questo tipo di situazioni stressanti, la loro natura preliminare e la numerosità ancora scarsa del campione non ci consentono ancora di trarre alcuna inferenza in generale, e in particolare rispetto all'impatto dei fattori ambientali e costituzionali sulla risposta allo stress dall'infanzia all'età prescolare.

INDIVIDUAZIONE DI INDICATORI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI PRECOCI IN BAMBINI IN ETÀ PREScolare CON RITARDO O ASSENZA DELLE ABILITÀ LINGUISTICHE E SOCIO-COMUNICATIVE: UNO STUDIO LONGITUDINALE

DR. ANGELO MASSAGLI

E-MAIL: ANGELO.MASSAGLI@OS.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Ostuni

RIASSUNTO

Razionale

Negli ultimi anni, sono state condotte numerose ricerche sull'individuazione dei primi segni di problematiche psicopatologiche in età evolutiva. Le conoscenze, fino ad ora acquisite, rispetto agli indicatori diagnostici sono relative soprattutto ai primi anni di vita e basate sull'analisi degli home video di bambini con autismo; mentre pochissimi sono gli studi che ne valutano l'evoluzione. L'importanza di tali indicatori ai fini di una precoce diagnosi differenziale, della prognosi e di un trattamento riabilitativo, induce ad ulteriori ricerche mirate alla rilevazione di tali indicatori anche in termini evolutivi e per una possibile prevenzione ed intervento.

Obiettivi

- 1) confermare attraverso l'analisi degli home video quanto rilevato nella letteratura internazionale rispetto alla rilevazione di indicatori precoci diagnostici nell'autismo;
- 2) individuare e confrontare le variabili socio-comunicative oggetto di studio in quadri clinici diversi: disturbi pervasivi dello sviluppo e disfasia evolutiva;
- 3) valutare la possibilità, attraverso un'osservazione longitudinale, di individuare parametri inerenti sia alle traiettorie evolutive degli indicatori precoci che alla loro differenziazione.

Metodo

Il campione è costituito da tutti i bambini di età prescolare afferenti al nostro

Istituto con assenza o ritardo del linguaggio verbale e con penalizzazione delle abilità socio-comunicative. Essi sono sottoposti ad una valutazione multidisciplinare (valutazione neuropsichiatrica infantile, psicolinguistica, psicologica e neuropsicologica) finalizzata alla diagnosi. Si sono individuate 2 categorie diagnostiche: Disturbi Pervasivi dello Sviluppo (comprendenti Disturbo Autistico e DPS NAS) e Disturbi Specifici del Linguaggio di tipo Misto. Si è elaborata una check-list di codifica creata ad hoc per siglare le variabili oggetto dello studio. I dati sono raccolti attraverso videoregistrazioni in 3 tempi diversi: T0, primo anno di vita (home video), T1 (3-4 anni) quando arrivano in valutazione per la prima visita e T2 dopo 6 mesi – quando tornano per il follow-up. Le codifiche degli indicatori individuati attraverso i filmati (home video, video della 1 visita e video del follow-up) sono effettuate in termini di frequenza e durata attraverso l'Observer XT.7 (Noldus 2007), software specifico per l'osservazione e la misurazione del comportamento. I codificatori sono stati addestrati alla somministrazione della nostra griglia di codifica attraverso l'utilizzo di video di bambini sia patologici che con sviluppo tipico (questi ultimi esclusi dal presente studio), allo scopo di acquisire competenza e dimestichezza nei processi di codifica e identificare correttamente gli item. I codificatori sono in cieco rispetto alla diagnosi dei bambini. Il training è stato completato e ciascun codificatore ha ottenuto un accordo soddisfacente (Cohen's Kappa $\geq 0,8$) con un clinico esperto. L'analisi dei dati sarà effettuata mediante test statistici. Un'analisi sequenziale sarà eseguita per la rilevazione di possibili correlazioni.

Risultati e prodotti conseguiti

Sono stati raccolti tutti i consensi informati da parte dei genitori prima dell'arruolamento; è stata raggiunta una buona numerosità del campione (50 soggetti, di cui 23 con home video); sono stati analizzati e catalogati gli home video secondo criteri già utilizzati in letteratura (per evento, per durata, per presenza di momenti di interazione reciproca); sono stati codificati tutti i dati raccolti sinora, creando apposite griglie con l'utilizzo del software Observer XT.7.

Attività previste per il 2010

Aumentare la numerosità del campione fino ad arrivare ad almeno 50 soggetti con home video; procedere con follow up a T2; avviare analisi statistiche.

SINDROMI EPILETTICHE CRIPTOGENICHE ASSOCIATE O MENO A COMPROMISSIONE NEUROLOGICA: ASPETTI NEUROFISIOLOGICI E DI GENETICA MOLECOLARE

DR. CLAUDIO ZUCCA

E-MAIL: CLAUDIO.ZUCCA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4
Neurofisiopatologia Clinica e
Sperimentale

Tipo di ricerca
Corrente

Periodo di svolgimento
2009

Polo scientifico
Bosisio Parini

RIASSUNTO

Come noto dalla letteratura, nel 20-30% dei casi di epilessia (E) il problema eziologico rimane insoluto. Nella nostra casistica di E, in cui il 62% circa è in età pediatrica, l'eziologia risulta sconosciuta nel 40% dei casi e l'insufficienza mentale (IM) si associa nel 42%.

Negli ultimi anni l'Unità Operativa di Neurofisiopatologia dell'IRCCS E. Mea si è dedicata allo studio delle caratteristiche neurofisiopatologiche delle cerebropatie con manifestazioni parossistiche (epiletiche e non) senza eziologia nota; alcune di queste, dopo indagini di genetica molecolare, sono risultate associate a canalopatie.

L'attività di ricerca del 2009 ha continuato a prendere in esame pazienti affetti da E ad eziologia non definita e a selezionare i casi da sottoporre ad analisi molecolare per l'individuazione di mutazioni in geni che codificano sia per canali ionici sia per altre proteine implicate nell'epilettogenesi (oltre a SCN1A, SCN1B, SCN2A, CACNA1A, KCNQ2, GABRG2, anche ATP1A2, CHRNB2, LGI1).

I criteri elettroclinici principali e comuni a tutte le forme sopracitate per selezionare i pazienti sono stati: eziologia sconosciuta, RMN encefalo negativa o aspecifica, familiarità possibilmente positiva per epilessia, IM di vario grado ma anche assente.

I dati neurofisiologici hanno incluso registrazioni EEG-poligrafiche e/o polisunnografiche mediante sistemi computerizzati e, in alcuni casi, potenziali evocati multimodali.

Parallelamente alle indagini di biologia molecolare mirate alla ricerca di mutazioni di geni specifici di sindromi epilettiche, sono state ricercate cause genetiche di cerebropatie anche mediante altre tecniche (analisi del cariotipo su

almeno 100 mitosi, FISH, studio di riarrangiamenti subtelomerici e, in pochi casi recenti, CGH-array).

Sono stati reclutati, nel corso del 2009, 28 casi, di cui 20 probandi e 8 familiari. Sono risultati positivi 9 test bio-molecolari per mutazione di SCN1A in 7 probandi e in 2 familiari (padre e madre di 2 probandi diversi). Sono inoltre risultati positivi 2 test bio-molecolari in 2 probandi non tuttavia per mutazione di SCN1A, ma per polimorfismi dello stesso gene.

I quadri clinici associati a mutazioni in SCN1A sono stati così distinti: GEFS in 2 casi, SMEI in un caso, SMEB in 3 casi ed E focale criptogenica in un caso. I casi di GEFS, SMEI e SMEB sono in linea con quanto precedentemente riportato in letteratura.

Riguardo al caso di E focale criptogenica si tratta di un bambino (7aa) che presenta, oltre a crisi epilettiche focali, IM grave, sindrome cerebellare con atassia e atrofia cerebellare progressiva documentata con RMN encefalo. L'analisi di mutazione del gene SCN1A ha rilevato due variazioni nucleotidiche, riscontrate anche nella madre che ha presentato solo un episodio di CF. Anche se in letteratura non vi sono dati analoghi, questo caso, oltre a confermare il ruolo di SCN1A in diversi tipi di E, suggerisce anche un possibile coinvolgimento di SCN1A nel determinare quadri neurologici con interessamento cerebellare non strettamente correlati all'andamento dell'epilessia.

Oltre ai casi risultati positivi alle indagini per mutazioni di canali ionici, sono da segnalare due casi di E criptogenica, focale in un caso e generalizzata nell'altro, in cui la causa genetica è stata riscontrata con altre tecniche: l'analisi del cariotipo su almeno 100 mitosi ha permesso di diagnosticare nel caso di E focale la presenza di cromosoma 20 ad anello; la CGH-array ha permesso di diagnosticare, invece, nel caso di E generalizzata, una duplicazione a livello di X (p11.22-p11.23).

Questi risultati ci spingono ad applicare anche nella futura ricerca queste tecniche, in particolare la CGH-array, che sembra particolarmente indicata per casistiche come quella del nostro Istituto in cui l'E si associa frequentemente a ritardo mentale e spesso anche a dismorfismi o a quadri sindromici.

L'intenzione è di proseguire nella selezione dei pazienti affetti da E criptogeniche da sottoporre ad indagine molecolare ed integrare poi i dati clinici e genetici con quelli ottenuti dalle indagini di neurofisiologia per cercare una più precisa correlazione tra genotipo e fenotipo.

STUDIO CLINICO-ELETTROENCEFALOGRAFICO ED EVOLUZIONE PROGNOSTICA DELLE EPILESSIE SINTOMATICHE CON CRISI A TIPO SPASMI CON ESORDIO NELLA PRIMA INFANZIA

DR. ANTONIO TRABACCA

E-MAIL: ANTONIO.TRABACCA@OS.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Sperimentale

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

Ostuni

RIASSUNTO

Gli spasmi infantili sono una forma di epilessia ad esordio nella prima infanzia (generalmente entro i primi 2 anni di vita) con incidenza pari a 1/3225 nati vivi (Frost and Hrachovy 2005).

È caratterizzata da una sintomatologia critica e da un pattern EEG critico ed intercritico ben definito, con associata alterazione dello sviluppo psicomotorio. Le crisi sono del tipo motorio e sono caratterizzate da improvvise, simultanee e simmetriche contrazioni di gruppi muscolari del capo, del tronco e degli arti della durata di circa 1 secondo con conseguenti movimenti in flessione e/o in estensione. Possono manifestarsi anche in modo asimmetrico. Nel 70-80% dei casi si presentano in cluster ed usualmente si associano ad altri fenomeni critici di difficile individuazione (subtle spasms) come fenomeni di staring, risveglio improvviso, deviazione oculare, pause respiratorie, fenomeni autonomici. L'EEG intercritico è nella maggior parte dei casi caratterizzato da un quadro di ipsaritmia, sebbene possa anche essere assente, che si interrompe durante l'evento critico. Nel 2004, è stato istituito un Consensus Statement (West Delphi Group) che ha dato nuove indicazioni rispetto ai criteri classificativi, etiologici e di management degli spasmi epilettici. Allo stato dell'arte, nessuna delle molte condizioni morbose predisponenti è stata associata in maniera univoca e invariabile al manifestarsi degli spasmi. La variabilità e non specificità delle condizioni morbose predisponenti si contrappone alla sostanziale specificità delle caratteristiche cliniche ed elettroencefalografiche dell'epilessia a tipo spasmi infantili e all'età d'esordio.

Il nostro studio, clinico-osservazionale, di tipo retrospettivo, ha studiato una popolazione di pazienti con epilessia a tipo spasmi infantili ad etiologia sintomatica ed in particolare le caratteristiche cliniche-elettroencefalografiche,

le diverse condizioni morbose associate interessanti l'encefalo, la risposta alla terapia farmacologica e l'evoluzione clinica ad un follow-up di 24 mesi dall'esordio e all'arruolamento (coincidente con il reclutamento allo studio) allo scopo di individuare una eventuale correlazione tra i dati etiologici, clinici ed EEG all'esordio e il tipo di risposta alla terapia e l'evoluzione clinico-elettroencefalografica di questa forma di epilessia. Nel nostro studio abbiamo voluto abbracciare i criteri di studio proposti dal consensus statement del West Delphi Group ed esaminare una popolazione selezionata di pazienti con spasmi infantili sintomatici, determinati da encefalopatie di certa etiologia e dal corso non progressivo.

Il campione è costituito da pazienti in età evolutiva, affetti da epilessia a tipo spasmi infantili, ad etiologia sintomatica, reclutati consecutivamente presso il nostro reparto tra il 30 Gennaio 2008 ed il 30 novembre 2008 e dal 30 Gennaio 2009 al 30 Novembre 2009. Abbiamo a tutt'oggi reclutato 34 pazienti affetti da Epilessia a tipo Spasmi Epilettici ad etiologia sintomatica con cerebrolesioni congenite o acquisite di natura non progressiva.

Dai dati fin qui raccolti emerge una sostanziale sovrapposizione tra quanto emerso relativamente alle caratteristiche cliniche-etologiche-EEG dei pazienti con epilessia a tipo spasmi infantili di origine sintomatica da noi esaminati e quanto già presente in letteratura. Nello specifico, abbiamo riscontrato un outcome sfavorevole per i soggetti con esordio precoce, con elevata frequenza di crisi all'esordio e scarsa risposta alla terapia farmacologica, presenza del quadro di ipsaritmia e persistenza di crisi molto frequenti al 12° e al 24° mese dall'esordio. L'outcome sfavorevole rispetto alla frequenza delle crisi e alla possibilità di una corretta maturazione del pattern EEG oltre che la persistenza di anomalie EEG molto attive, condiziona negativamente anche lo sviluppo cognitivo. La stratificazione del nostro campione relativa all'etiologia sottostante può aver determinato un bias rispetto all'outcome cognitivo (netta prevalenza dei soggetti con ritardo mentale) e neuromotorio.

Rispetto all'etiopatogenesi, i nostri dati confermano quanto già emerso in letteratura circa l'estrema variabilità di anomalie morfo-strutturali (corticale, sottocorticali) sottostanti il manifestarsi degli spasmi epilettici; ciò non sembra apportare alcun dato aggiuntivo rispetto alle diverse ipotesi etiopatogenetiche formulate rispetto all'etiologia degli spasmi, cioè la dicotomia tra quanti ritengono che l'etiopatogenesi sia da ricercare in una ben definita anomalia strutturale (Goldestein J et al 2008) e quanti ritengono che la patofisiologia degli spasmi epilettici sia in realtà da imputare ad un aspecifico meccanismo neuropatologico, comune a tutte le condizioni morbose predisponenti (Mischel and Vinters 1997).

Dall'esame dei dati già ottenuti, il rilievo di un danno della sola sostanza bianca individuato nel 29.5% dei casi e la presenza di danni associati della grigia

e della bianca nei restanti ci ha suggerisce un approfondimento in merito al possibile ruolo etiopatogenetico della sostanza bianca nell'epilettogenesi, dato confermato da recenti studi condotti con le nuove tecniche di RMN (DTI) e pubblicate negli ultimi anni (Hutchinson E 2009; Rugg-Gunn FJ 2001; Eriksson S H 2001).

Con tale obiettivo, nella terza fase del nostro studio, oltre che ad ampliare la casistica e proseguire nel follow-up, stileremo un protocollo per effettuare studi neuroradiologici con nuove tecniche di RMN (DTI) al fine di individuare eventuali alterazioni specifiche della sostanza bianca in pazienti con un buon outcome clinico e in pazienti con persistenza di crisi del tipo spasmi epilettici.

VALUTAZIONE DI FUNZIONI COGNITIVE SPECIFICHE IN SOGGETTI IN ETÀ EVOLUTIVA CON EPILESSIA: CORRELAZIONI CON IL TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

DR. MARCO GUBERNALE

E-MAIL: MARCO.GUBERNALE@CN.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Sperimentale

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2009

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

RIASSUNTO

Per contribuire all'inquadramento della funzionalità cognitiva rispetto ad un disturbo neurologico ancora poco indagato dalla neuropsicologia si è somministrato effettuato l'assessment neuropsicologico di un gruppo di 14 pazienti affetti da Epilessia frontale notturna (EFN), di età compresa tra 3.8 e 17.2 anni, con $\mu=11.5$ e $s=3.9$, composto da 12 maschi e 2 femmine, con monoterapia per 11 soggetti, dei quali 6 con Carbamazepina, e in politerapia per gli altri, con due casi di farmacoresistenza. Le anomalie EEG si concentrano nelle regioni anteriori bilateralmente in 8 soggetti e rispettivamente a destra e a sinistra in 3 soggetti per lato, a quadro neuroradiologico muto tranne un caso. L'anamnesi psicologica mette in evidenza difficoltà di attenzione e difficoltà scolastiche diffuse a tutto il campione, ma non storie suggestive di difficoltà specifiche di apprendimento, tranne nei soggetti con insufficienza intellettiva rilevata in corso di ricovero o già diagnosticata.

A 5 soggetti, dei quali tre maschi e due femmine, 43% del campione, è stata effettuata una valutazione neuropsicologica di follow up successivamente all'instaurazione o alla modifica della terapia farmacologica: in un caso è stata inserita Melatonina, mentre negli altri pazienti si è inserita Carbamazepina e in due soggetti si è sostituito Topiramato con Clobazam.

Lo studio ha incluso anche un gruppo di pazienti con Epilessia a differente eziologia per il confronto delle prestazioni, composto da 14 pazienti epilettici ad esso abbinato mediante matching per età e QI, composto da 7 maschi e da 7 femmine, con 8 soggetti con Epilessia del lobo temporale, 5 con Epilessia del lobo occipitale e 1 con Epilessia rolandica.

I dati più significativi documentano: Intelligenza mediamente nella norma, seppure con discrepanza sfavorevole per il dominio verbale rispetto a quello

nonverbale; Attenzione integra; lieve ipofunzionalità in senso Esecutivo di natura verbale, soprattutto rispetto a Memoria di lavoro, e rispetto alla pianificazione di un compito; spunti Psicopatologici internalizzati; sostanziale stabilità del quadro cognitivo, tranne un lieve calo di natura Esecutiva.

Dunque, dal nostro campione risulta che l'EFN sia meno aggressiva in senso cognitivo rispetto ad altre forme di Epilessia frontale, e che l'impairment cognitivo sia selettivamente rivolto alle competenze prefrontali. Inoltre, in considerazione della variabilità ottenuta nella distribuzione dei risultati riguardanti Intelligenza e Attenzione, si sviluppano ipotesi a favore dell'esistenza di fenotipi cognitivi specifici per le tipologie della mutazione dei recettori nicotinici.

RICERCA DI MICRODELEZIONE CON ARRAY-CGH IN PAZIENTI CON EPILESSIA E FENOTIPI SINDROMICI

DR. PAOLO BONANNI

E-MAIL: PAOLO.BONANNI@CN.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4
Neurofisiopatologia Clinica e
Sperimentale

Tipo di ricerca
Corrente

Periodo di svolgimento
2009

Polo scientifico
Conegliano e Pieve di Soligo

RIASSUNTO

L'epilessia è una delle più gravi e frequenti malattie neurologiche in età evolutiva. Le forme geneticamente determinate includono sia quelle idiopatiche, monogeniche o poligeniche, o le forme sintomatiche/criptogenetiche nelle quali il disturbo epilettico avviene in un paziente con altre caratteristiche come il ritardo mentale, disturbo del comportamento/autismo, dimorfismi multipli e anomalie congenite della corteccia cerebrale.

La tecnica del array CGH (Comparative Genomic Hybridisation) permette di definire a livello molecolare i riarrangiamenti cromosomici e di investigare la presenza di anomalie cromosomiche criptiche non reperibili tramite le classiche tecniche di tipo citogenetico. È sempre meglio evidente che le delezioni/duplicazioni criptiche, anche note come copy number variations (CNVs), possono spiegare la causa genetica in quei pazienti con un fenotipo sindromico nei quali la mappa cromosomica è normale. Risulta quindi evidente che attualmente la tecnica più promettente per scoprire delezioni/duplicazioni criptiche associate a specifiche forme di epilessia è l'array CGH. L'applicazione di questa tecnica potrebbe rivelare nuovi hotspots per la scoperta di geni dell'epilessia.

Questa ricerca è complementare alla ricerca corrente in corso della Linea di Neurofisiopatologia che vede come candidato eziologico delle epilessia criptogenetiche un'alterazione del gene SCN1A. Nel corso del primo anno di ricerca abbiamo selezionato un campione di 10 pazienti con epilessia criptogenetica. I criteri principali di inclusione sono stati la presenza di un'epilessia spesso ad esordio precoce, ma non necessariamente, la assenza di una causa evidente delle crisi epilettiche e l'assenza di dimorfismi maggiori somatici o cerebrali.

Metodologia

Campione studiato dopo il primo anno di ricerca: 10 pazienti con epilessia criptogenetica

Metodi: definizione del fenotipo epilettico, clinico, neuro radiologico. Una commissione costituita dai 3 responsabili ha valutato l'appropriatezza dell'effettuazione dell'esame genetico

Genetica molecolare

Estrazione Del Dna da sangue

Il DNA genomico è stato estratto secondo un protocollo standard di estrazione da sangue venoso.

Analisi mediante Array-CGH

L'array-CGH è stata effettuata mediante l'Agilent Human Genome CGH Microarray risoluzione media 50 Kb. Questo sistema consiste di microarray con sonde oligonucleotidiche di 60 basi specifici per tutte le regioni del genoma umano che permettono l'indagine dell'intero genoma ed il delineamento molecolare delle aberrazioni genomiche..

Risultati e commenti

La tabella 1 riassume le caratteristiche del campione e i risultati genetici.

ID/in/sex	DOB	Diagnosi	Piattaforma	Risol	Risultato	Reference
1/ PA / M	16/02/03	Spettro SMEI	105k	60kb	Normale	Coriell
2/ BF / M	7/08/03	Spettro SMEI	180k	40Kb	Del 16q23.3-q24.1	Coriell
3/ DV/ F	8/7/00	Spettro SMEI	180k	40Kb	Normale	Coriell
4/ CG / F	26/09/99	EMA	180k	40Kb	Del Xp22.31	Coriell
5/ VL / M	0/03/90	LGS	180k	40Kb	Normale	Coriell
6/ CiG / F	3/11/05	Celiachia	180k	40Kb	Normale	Coriell
7/ SA / M	23/12/03	Spasmi	180k	40Kb	Normale	Coriell
8/ VF / M	28/09/92	E Focale	180k	40Kb	Del 18q22.1	Coriell
9/ SC / F	26/05/93	E Focale	180k	40Kb	Normale	Coriell
10/CA/ M	23/07/92	E Focale	180k	40Kb	Dup 22q13.1	Coriel

Sinteticamente su 10 pazienti analizzati con epilessia criptogenetica, 4 presentano alterazioni del CGH array, in particolare 3 delezioni e 1 duplicazione. Stiamo studiando la possibile relazione tra il fenotipo clinico/epilettico e l'alterazione genetica sui singoli casi.

Nel corso del prossimo anno di ricerca verrà completata la selezione dei pazienti ed effettuata l'analisi genetica sull'intero campione di pazienti.

RUOLO DELLA DINAMICA INTRACELLULARE DEI MITOCONDRI NELLA PATOGENESI DELLE NEUROPATIE PERIFERICHE

PROF. EMILIO CLEMENTI

E-MAIL: EMILIO.CLEMENTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5
Neurobiologia

Periodo di svolgimento
2009

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

RIASSUNTO

Molte delle neuropatie periferiche sono causate da mutazioni in geni che controllano direttamente o indirettamente i processi di fusione e fissione mitocondriale. Nostri studi preliminari hanno dimostrato che il nitrossido è coinvolto nella regolazione sia acuta che cronica dei processi di fissione e fusione mitocondriale, svolgendo anche funzioni importanti nella omeostasi neuronale e muscolare. Lo scopo della ricerca è duplice: chiarire i meccanismi molecolari attraverso cui il nitrossido regola l'azione di DRP-1 e delle altre proteine coinvolte nelle neuropatie; verificare se mutazioni parogenetiche in queste specifiche proteine modificano l'azione del nitrossido a livello mitocondriale e se questo evento può contribuire allo sviluppo di una neuropatia periferica attraverso lo studio del ruolo di NO e della fusione/fissione dei mitocondri nel differenziamento muscolare, incluso il ruolo di NO nella funzione mitocondriale. Rilevante allo studio è anche la definizione dei bersagli molecolari dell'azione dell'NO nella fusione/fissione mitocondriale.

I risultati conseguiti nei tre anni di lavoro suggeriscono che NO giuochi un ruolo cruciale nella fasi precoci della miogenesi e che la sua azione a questo livello sia mediata dal controllo dei fenomeni di fissione/fusione mitocondriale. In particolare i dati ottenuti dimostrano che la fusione mitocondriale è un evento precoce richiesto perchè inizi il processo miogenetico. Al processo di fusione si accompagnano cambiamenti bioenergetici significativi: i mitocondri fusi hanno una attività bioenergetica normale, mentre i mitocondri fissi presentano una ridotta capacità di generare ATP anche se in presenza di un potenziale di membrana mitocondriale corretto. Studi con il bloccante della ATPasi mitocondriale oligomicina hanno dimostrato che il mantenimento del potenziale di membrana in queste condizioni era dovuto ad un funzionamento inverso della ATPasi mitocondriale che consumava ATP invece di generarlo, per mantenere il gradiente protonico mitocondriale. Il ruolo di NO è proprio

nel controllo del processo di fissione/fusione mitocondriale. In particolare abbiamo dimostrato che NO inibisce la fissione mitocondriale attraverso una inibizione della attività GTPasica della proteina fissogena DRP-1, nonché della inibizione della sua traslocazione al mitocondrio. Il controllo su DRP-1 da parte di NO è esercitato attraverso la generazione di GMP ciclico, attivazione della protein kinasi G e fosforilazione. Le implicazioni di questo studio sono rilevanti nello studio dei meccanismi molecolari conseguenza del difetto genetico osservato in corso di malattie degenerative nervose e muscolari, quali la distrofia muscolare di Duchenne, suggeriscono un ruolo chiave nel controllo del differenziamento cellulare muscolare da parte della proteina DRP-1 che quindi può essere un possibile bersaglio terapeutico.

MECCANISMI MOLECOLARI DI NEURODEGENERAZIONE IN FORME DI SLA AD ESORDIO GIOVANILE (ALS2-ALS4), APOPTOSI, CITO-TOSSICITÀ E IPERSENSIBILITÀ AL DANNO OSSIDATIVO: STUDIO DEL RUOLO DELLE PROTEINE SENATAXINA E ALSINA

DR.SSA MARIA TERESA BASSI

E-MAIL: MARIATERESA.BASSI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5
Neurobiologia

Periodo di svolgimento
2009

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

RIASSUNTO

L'attività del II anno di questo progetto di R corrente si è focalizzata sulla caratterizzazione della senataxina e del suo ruolo nel differenziamento neuronale e nella dendritogenesi. La senataxina è il prodotto del gene SETX coinvolto in una forma di SLA giovanile chiamata ALS4 e in una forma di neuropatia e atassia recessive chiamata AOA2. I dati disponibili in letteratura per quanto limitati indicano una localizzazione della proteina prevalentemente nucleare compatibile con la sua funzione di RNA-DNA elicasi ipotizzata in base alla presenza di un dominio elicastico. Inoltre linee linfoblastoidi di pazienti con mutazione in omozigosi in SETX mostrano una accentuata sensibilità al danno ossidativo sul DNA (Suraweera 2007). In questo anno di attività ci siamo focalizzati sulla caratterizzazione del ruolo di senataxina nel differenziamento e sviluppo del neurone in modelli cellulari e in neuroni primari murini identificando un ruolo di senataxina nel processo di dendritogenesi. Abbiamo inoltre analizzato due forme diverse di senataxina mutata con alterazioni individuate in pazienti con mutazioni recessive identificate in questo istituto. È stato osservato che la delezione di un singolo aminoacido della proteina senataxina promuove ipersensibilità agli effetti tossici di tre diversi agenti comunemente utilizzati mentre una diversa mutazione nonsense nel dominio N-terminale della proteina è associata a una risposta paragonabile a quella di cellule di controllo. In altre parole, l'assenza del fenotipo "ipersensibilità" in cellule che e non esprimono la proteina indicherebbe che specifiche mutazioni sono in grado di promuovere eventi che definiscono i presupposti della risposta tossica evocata dagli agenti tossici utilizzati.

STRESS OSSIDATIVO E MICOTOSSINE NELLA SINDROME AUTISTICA

DR.SSA MARIA ELISABETTA RAGGI

E-MAIL: MARIAELISABETTA.RAGGI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5
Neurobiologia

Periodo di svolgimento
2009

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

RIASSUNTO

L'autismo o i disordini dello spettro autistico, secondo l'Autism Society of America, devono oggi essere considerati un'epidemia. Sulla base di statistiche dell'US Department of Education (USDE) e di altri enti governativi, l'autismo sta crescendo del 10-17% all'anno (USDE, 2003). L'aumento della consapevolezza pubblica e l'allargamento dei criteri di valutazione potrebbero essere fattori contributivi, ma l'incremento sostanziale nell'incidenza dell'autismo, rilevato da questi studi epidemiologici, implica l'importanza di fattori esterni o ambientali, che possono essere cambiati nel corso del tempo.

L'autismo è infatti oggi considerato un disordine multifattoriale con una componente genetica importante ma parimenti influenzato da fattori ambientali. Si potrebbe ipotizzare che alcuni elementi ambientali normalmente innocui possano interferire negativamente in soggetti più vulnerabili, perché geneticamente predisposti. Inoltre, vi sono sempre più evidenze del fatto che alcuni bambini affetti dallo spettro autistico hanno manifestato regressione nella socialità, nel linguaggio e nel comportamento, in un'età compresa tra 1 e 2 anni, ipotizzando l'insorgenza di un danno o un insulto neuronale, avvenuto dopo la nascita.

Non è poi del tutto chiaro se i disturbi neurologici siano di natura primaria o se il malfunzionamento di un altro sistema influenzi negativamente il sistema neurologico. Studi biomedici sull'autismo hanno rilevato una varietà di anomalie non solo nel sistema neurologico ma anche in quello immunitario e digestivo.

La presente ricerca solleva ed indaga la possibilità che tossicità e stress ossidativo, indotti dalle micotossine, introdotte con la dieta, e prodotte dai miceti che colonizzano l'intestino nei fenomeni di disbiosi, possano essere correlate con le caratteristiche cliniche spesso riscontrate nei bambini autistici.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI SOGGETTI CON DELEZIONE 22Q13 E ALTRE ANOMALIE CROMOSOMICHE MEDIANTE ARRAY-CGH

DR.SSA MARIA CLARA BONAGLIA

E-MAIL: CLARA.BONAGLIA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Strutture dell'IRCCS Medea: Laboratorio di Citogenetica, Laboratorio di Biologia Molecolare

Dipartimento di Biologia Generale e Genetica Medica, Università di Pavia

Laboratorio di Citogenetica, Istituto G. Gaslini, Genova; Genetica Medica

RIASSUNTO

Nel primo anno di attività abbiamo analizzato a livello molecolare in 40 pazienti con delezione subtelomerica 22q13, 9 casi con duplicazione Xp11.2, 3 casi con delezioni criptiche che coprono la regione 19p13.12. I nostri dati hanno permesso di stabilire che i punti di rottura coinvolgenti la regione subtelomerica 22q13.3 sono estremamente variabili, che la duplicazione Xp11.22-11.23 costituisce una nuova sindrome, che la regione 19p13.12 contiene possibili geni candidati per il ritardo mentale e disturbi comportamentali osservati nei soggetti portatori della delezione 19p13.

Abbiamo infine raccolto e studiato 8 casi con traslocazioni sbilanciate de novo per i quali abbiamo ipotizzato un meccanismo di formazione di questi riarrangiamenti sulle base dei risultati ottenuti mediante array-CGH.

MALATTIA DEL MOTONEURONE: STUDIO FUNZIONALE IN DROSOPHILA DEL GENE SENATAXINA, RESPONSABILE DI FORME PRECOCI DI MND

DR.SSA GENNY ORSO

E-MAIL: GENNY.ORSO@UNIPD.IT

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

RIASSUNTO

Lo sviluppo del modello di *Drosophila* per il gene cg7504, omologo al gene umano senataxina, prevedeva nel corso del primo anno di lavoro di affrontare i seguenti aspetti sperimentali:

1. Identificazione del gene di *Drosophila* omologo al gene umano senataxina, coinvolto in una forma giovanile di Sclerosi Amiotrofica Laterale.
2. Analisi della sequenza aminoacidica per definire domini funzionali della proteina e identificare possibili aminoacidi da utilizzare per la mutagenesi mirata e generare sia mutazioni funzionali che riprodurre mutazioni patologiche.
3. Estrazione di RNA da *drosophila* e conseguente retro trascrizione e clonaggio del cDNA del gene di interesse e sequenziamento per valutare la presenza di mutazioni
4. Clonaggio di costrutti per in knockdown mediato da RNAi
5. Ricerca di possibili p-element negli stock center di *Drosophila* da utilizzare come potenziali mutanti del gene senataxina
6. Sviluppo di anticorpi contro la senataxina di *Drosophila*.

Tutti gli obiettivi sopra indicati sono stati rispettati con l'eccezione della generazione del costrutto contenente il cDNA di senataxina per la presenza di mutazioni all'interno della sequenza clonata. Il cDNA è ancora in fase di clonaggio.

Per quanto concerne l'analisi della sequenza proteica abbiamo confermato la presenza dei domini e motivi principali contenuti anche nella proteina umana quali: FHA domain, DNA/RNA helicase domain e svariati motivi di localizzazione nucleare disseminati lungo tutta la sequenza proteica. Sono stati anche identificati gli aminoacidi conservati per generare mutazioni pato-

logiche all'interno della proteina.

I costrutti per il knockdown sono stati generati e inviati alla ditta di riferimento per la generazione di animali transgenici. Gli anticorpi contro senataxina di *Drosophila* sono stati disegnati nella parte N-terminale e C-terminale della proteina e sono in fase di produzione (epitopi : 1-DDARKRKVYFNLDRDDVND 2 KQKGRRSKSKSPNDH).

Sono state identificate due linee potenzialmente utili per generare mutanti di senataxina.

Obiettivi sperimentali nella prosecuzione del progetto

In questa seconda fase del progetto gli obiettivi sperimentali proposti sono i seguenti:

1. Analisi delle linee mutanti w^{1118} ; $Mi\{ET1\}CG7504^{MB04533}$ e $PBac\{WH\}f05408$: per determinare eventuali alleli loss of function, ipomorfi o gain of function. L'RNA sarà estratto e retro trascritto e testato con PCR per identificare la presenza di interruzioni nel CDNA. Per generare ulteriori mutanti saranno utilizzate delle linee di trasposasi specifiche per i due diversi p-element che permetteranno la loro escissione dal genoma e conseguente generazione di piccole delezioni o mutazioni nelle zone adiacenti al loro inserimento.
2. I mutanti generati nel primo step saranno poi analizzati dal punto di vista della letalità, di fenotipi neuronali e muscolari, per difetti di locomozione e fenotipi visibili a carico di altri tessuti.
3. Saranno generate mutazioni patologiche a carico della proteina: le mutazioni sono state scelte in modo da interessare diversi domini funzionali di senataxina.
4. Gli anticorpi generati contro senataxina saranno testati su tessuti di *Drosophila* per la caratterizzazione dell'espressione endogena della proteina, su alleli mutanti per definire l'efficienza di knockdown della stessa, su eventuali linee transgeniche per la sovra espressione della proteina wild type.
5. Eventuali fenotipi dovuti ad alleli o transgeni gain e loss e gain of function saranno utilizzati per l'analisi delle vie di riparazione del DNA. Verrà utilizzato un reporter specifico generato in *Drosophila* ($rp3$) per la caratterizzazione di difetti nelle varie vie della riparazione del DNA.

NEUROPATIE PERIFERICHE SENSITIVO-MOTORIE: FUNZIONALITÀ MITOCONDRIALE IN MODELLI CELLULARI

PROF. NEREO BRESOLIN

E-MAIL: NEREO.BRESOLIN@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO

Le neuropatie periferiche sensitivo-motorie (HMSN o CMT) sono un gruppo di malattie ereditarie a carico del sistema nervoso periferico. Nel complesso le CMT si presentano con una frequenza di circa 30-36 casi ogni 100.000 nascite. La complessità e l'eterogeneità clinica delle neuropatie periferiche (CMT) in particolare quelle di tipo sensitivo e motorio supera ampiamente la semplice suddivisione fatta in base a dati elettrofisiologici (NCV) e istologici in forme demielinizanti (CMT1, CMT4, Dejerine-Sottas sindrome: DSS) e forme assonali (CMT2) con segregazione sia dominante che recessiva. A parte i valori dei parametri elettrofisiologici, le neuropatie sono in generale caratterizzate da debolezza muscolare distale ed atrofia che coinvolge prevalentemente gli arti inferiori e diminuzione od assenza dei riflessi tendinei profondi.

L'analisi genetica di una casistica di 43 pazienti con forme assonali sensitivo motorie con diversi geni implicati in queste forme (MFN2, APTX, SETX, GARS, YARS, HSPB1, HSPB8, GDAP1, Cx32, NEFLC, BSCL2) ha portato all'identificazione di 3 casi con mutazione in GDAP1, 1 caso con mutazione in APTX e 2 casi con mutazione in SETX. Mentre il fenotipo osservato nelle famiglie con mutazioni in SETX e in APTX correla con il fenotipo già osservato in letteratura, il fenotipo associato ai casi con mutazioni in GDAP1 risulta differire da quanto noto in letteratura. Tutte le famiglie con mutazioni in questo gene mostrano infatti il fenomeno dell'anticipazione in termini di età d'esordio della patologia e gravità del quadro clinico. I risultati di questo studio forniscono inoltre per la prima volta un valore di frequenza di mutazioni di questo gene nei casi dominanti di CMT2 del 27% che dovrà essere riconfermato in casistiche più ampie.

ALTERAZIONI BIOENERGETICHE NELLE DISTROFINOPATIE E RUOLO TERAPEUTICO DI UNA LORO CORREZIONE STUDIATE MEDIANTE ANALISI COMPARATIVA DI IMAGING FUNZIONALE, OSSIGRAFIA, IMMUNOISTOCHEMICA E PROVE FUNZIONALI

PROF. EMILIO CLEMENTI

E-MAIL: EMILIO.CLEMENTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO

Evidenze della letteratura indicano che nel corso delle distrofinopatie, sia in uomo che nei corrispondenti modelli murini, si verifica un'alterazione della bioenergetica del muscolo scheletrico, con riduzione del potenziale ossidoriduttivo mitocondriale ed alterazioni strutturali nei mitocondri stessi.

L'ossido nitrico (NO) svolge numerosi effetti benefici nel muscolo scheletrico preservandolo dal danno durante la contrazione, favorendo la vasodilatazione e quindi l'apporto di ossigeno e glucosio e controllando l'attività di importanti enzimi del metabolismo come creatinchinasi, aconitasi e gliceraldeide fosfato deidrogenasi. Inoltre controlla la mitocondriogenesi e quindi la produzione di ATP. La carente produzione di NO del muscolo distrofico è considerata aggravante della malattia.

Nostri studi preliminari indicavano che corretta funzionalità e morfologia mitocondriale sono essenziali per una corretta attivazione e un completo differenziamento delle cellule satelliti e quindi per il riparo tissutale.

Abbiamo anche evidenza che parte della funzione terapeutica di NO nelle distrofinopatie sia mediata dal mantenimento di una corretta funzionalità mitocondriale e/o dall'induzione di mitocondriogenesi nel muscolo scheletrico. Nello studio condotto abbiamo utilizzato topi α -sarcoglicano KO un ben caratterizzato modello di distrofia muscolare dei cingoli, esposto o meno a trattamento cronico con farmaci donatori di NO.

Abbiamo studiato l'outcome terapeutico e isolando singole fibre muscolari da diversi tipi di muscoli studiato mediante un ossigrafo ad alta sensibilità il consumo di ossigeno e l'attività dei complessi della catena respiratoria. Le stesse fibre sono state analizzate in microscopia per la misura del potenziale di membrana mitocondriale in presenza di specifici coloranti e mediante me-

todiche di risonanza magnetica funzionale.

I risultati hanno fornito una base scientifica importante per la valutazione della correlazione tra danno muscolare e metabolismo energetico fornendo anche informazioni essenziali per la valutazione dell'efficacia di futuri interventi terapeutici.

STUDIO DI TECNOLOGIE UTILIZZABILI ALL'INTERNO DI CAMPI MAGNETICI AD ALTA INTENSITÀ

SIG. MATTEO CAVALLERI

E-MAIL: MATTEO.CAVALLERI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 6
Bioingegneria

Periodo di svolgimento
2009

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

RIASSUNTO

Le tecnologie che permettono la diagnostica per immagini sono diventate uno strumento sempre più irrinunciabile nell'attività clinica e diagnostica grazie alla loro capacità di osservazione di aree dell'organismo non altrimenti visibili all'esterno. Tra queste tecnologie, la risonanza magnetica nucleare (NMR) è qualitativamente la più accurata nell'indagine dei tessuti molli rispetto alla tomografia computerizzata o alla tecnica radiologica. Il principio della NMR consiste nel porre un paziente in un campo magnetico ad alta intensità e contestualmente indagare la precessione dello spin dei protoni sotto l'effetto di tale campo. La necessità di immergere il paziente in un campo magnetico ad alta intensità crea molteplici problemi pratici, tra cui l'impossibilità di utilizzo di materiale anche parzialmente ferroso. Questo limite è maggiormente restrittivo nel momento in cui si vogliono indagare funzioni di tipo cognitivo: vi è infatti una penalizzazione rispetto agli esami effettuati con gli strumenti tradizionali nel corso dei quali è possibile erogare degli stimoli ai pazienti e successivamente rilevare le loro risposte.

Inoltre la forma toroidale del dispositivo di NMR nel quale si svolge l'esame isola il paziente da un punto di vista ottico e, parzialmente, acustico rendendo più difficoltosa sia l'interazione tra medico e paziente sia il controllo sul regolare svolgimento dell'esame. Anche gli spazi a disposizione all'interno del toroide sono fortemente limitati.

Tutti questi fattori richiedono dunque una progettazione ex-novo dei dispositivi di stimolazione ed acquisizione: il presente progetto si propone di individuare alcune tecnologie idonee ad un impiego congiunto con dispositivi di NMR. In particolare è stato preso in considerazione, come dispositivo esemplificativo, uno slit scanner ovvero un dispositivo in grado di ricostruire tridimensionalmente la superficie di un oggetto. Si tratta di un oggetto complesso in grado di fare emergere numerose problematiche rispetto alle quali

si è poi tentato di individuare delle soluzioni.

Lo slit scanner è un dispositivo particolarmente interessante, perché permette di rilevare la posizione ed i movimenti di un paziente durante l'esecuzione di un esame di risonanza. La possibilità di un rilevamento accurato di movimenti anche minimi, come ad esempio il movimento indotto dagli atti respiratori, permetterebbe di ridurre gli artefatti che il movimento introduce nella ricostruzione dell'immagine. Analogamente il monitoraggio di movimenti volontari richiesti al paziente, come ad esempio quelli di una mano o di un piede, permetterebbe di avere importanti informazioni nello studio in risonanza funzionale.

Durante l'anno corrente è stato in primis realizzato uno slit scanner con un metodo tradizionale.

Successivamente sono state analizzate le varie criticità rispetto all'impiego di tale dispositivo nei campi magnetici ad alta intensità e nei limiti volumetrici imposti dall'apparecchiatura di risonanza magnetica. Impiegando tecnologie che non perturbano e non vengono perturbate dal campo magnetico ad alta intensità è stato messo a punto un dispositivo in grado di superare alcune delle criticità rilevate nel sistema tradizionale. L'impiego del sistema proposto in risonanza magnetica presenta molti vantaggi rispetto ad un tradizionale slit scanner: non è presente il motore che muove il sistema di proiezione laser, inoltre l'eliminazione del motore semplifica la compatibilità magnetica. Il sistema proposto è più compatto, dunque può essere sottoposto più facilmente a schermatura. Le parti che compongono il sistema proposto sono quasi sempre costituite da componenti più semplici rispetto a quelli adottati negli slit scanner tradizionali, così da produrre meno interferenze elettromagnetiche e quindi richiedere una schermatura più blanda. Infine la ricostruzione della superficie avviene in real time rispetto ad un sistema tradizionale. Nel corso del 2010 ci si propone un completamento del lavoro iniziato nell'anno 2009, in particolare rispetto alla schermatura elettromagnetica necessaria al funzionamento di tale dispositivo nel campo ultra alto.

Il prototipo che è stato progettato nel corso del 2009 è stato verificato sperimentalmente in laboratorio attraverso le simulazioni della rete logica che successivamente dovrà essere sintetizzata su FPGA. Nel corso del 2010 si intende migliorare il dispositivo FPGA implementando una serie di automatismi, eventualmente sintetizzando anche l'algoritmo che provvede alla trasformazione dei dati acquisiti nelle coordinate 3D. Infine si cercherà di fornire una adeguata schermatura per un utilizzo all'interno della risonanza magnetica. Nel corso del progetto sarà anche possibile sperimentare diversi tipi di comunicazione (compatibile con i campi ultraalti) tra l'apparecchiatura inserita all'interno della risonanza magnetica ed i dispositivi riceventi esterni.

IDENTIFICAZIONE E STUDIO DI VARIANTI FUNZIONALI NEL GENOMA UMANO E ASSOCIAZIONE CON TRATTI FENOTIPICI

DR.SSA MANUELA SIRONI

E-MAIL: MANUELA.SIRONI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 7

Bioinformatica

Periodo di svolgimento

2009

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO

Nel corso di questo primo anno di attività su questo progetto abbiamo applicato un approccio innovativo che prevede l'utilizzo di strumenti di genetica di popolazione per identificare i geni che sono stati sottoposti a selezione e che dunque contengono varianti funzionali.

Il presupposto di partenza si basa sul concetto che le forze selettive possono agire su uno specifico locus solo se questo contiene una variante polimorfica funzionale. Tali forze, inoltre, lasciano un "segno" che può essere sfruttato per identificare le varianti sottoposte a selezione.

È noto che, durante la storia evolutiva dell'uomo, pathways specifici fondamentali per la sopravvivenza sono stati soggetti a pressione selettiva, ed è per questo che abbiamo applicato le metodiche di genetica di popolazione a geni di interesse biomedico quali, ad esempio, geni coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa, nel pathway della coagulazione e fibrinolisi, nella regolazione metabolica. Sono stati analizzati specificamente i seguenti geni: ACE, AVPR1B, ADRB2, ADRB3, AHI1 e CPB2. Per ciascuno di essi è stato studiato il pattern di selezione identificando le regioni interessate. Per ciascun gene i risultati sono stati analizzati mettendoli in relazione con quanto già noto in letteratura e per individuare le basi funzionali che spieghino la presenza di selezione. Abbiamo anche studiato alcune famiglie geniche. L'analisi dei loci che codificano per gli antigeni dei gruppi sanguigni (29 sistemi nell'uomo) ha indicato che molti di questi geni sono stati sottoposti a una pressione selettiva da parte dei patogeni e a selezione bilanciante. Similmente molti geni che codificano per interleuchine o loro recettori sono stati sottoposti a selezione dipendente dai patogeni e, in questo caso, gli elminti hanno rappresentato una pressione selettiva più forte rispetto a virus e batteri. Infine abbiamo verificato che 6 su 9 alleli di rischio per il morbo di Crohn o la celiachia, localizzati nei geni delle interleuchine, sono signifi-

cativamente associati alla ricchezza di micro-patogeni (virus/batteri/funghi/protozoi). Questi dati supportano quindi l'ipotesi dell'igiene per queste due patologie (che condividono alcuni alleli di suscettibilità) e rappresentano la prima prova "genetica" per tale teoria. Abbiamo inoltre studiato geni coinvolti nella risposta immune e nell'autoimmunità. Si ritiene che le malattie infettive abbiano rappresentato una delle maggiori minacce per le popolazioni umane e che abbiano agito come una potente forza selettiva. A tutt'oggi malgrado i progressi nel trattamento e nella prevenzione, le malattie infettive sono responsabili di circa il 48% delle morti nel mondo tra gli individui di età inferiore ai 45 anni. È perciò possibile che l'esposizione ai parassiti (batteri, virus, protozoi e elminti) abbia rappresentato la forza selettiva alla base dell'evoluzione di diversi geni, primariamente di quelli coinvolti nella risposta immunitaria, e che le tracce lasciate da questi patogeni rendano oggi più predisposte le popolazioni umane all'insorgenza di diverse malattie complesse sia tradizionalmente riferite all'ambito immunologico (malattie autoimmuni, asma, atopia, allergia) sia legate ad altri ambiti (tumori, ictus, obesità, depressione, autismo).

Per quanto riguarda l'analisi funzionale delle varianti identificate con i metodi citati sopra abbiamo messo a punto durante il primo anno una serie di strumenti software che, attraverso l'ottimizzazione degli algoritmi di calcolo, l'utilizzo parallelo del parco macchine del laboratorio, la riduzione dell'uso di memoria per i calcoli, rendano possibile l'applicazione di algoritmi di predizione (in particolare legati all'effetto delle varianti sui meccanismi di splicing) altrimenti impraticabili allo stato attuale della tecnologia. Questi strumenti sono raccolti in librerie software di uso generico che ne consentono lo sfruttamento in una grande varietà di applicazioni e, per questo, dopo una fase di test (secondo anno del progetto) metteremo a disposizione di altri ricercatori.

**PRAGMATICA DELLA COMUNICAZIONE E COMPORTAMENTO IN
SOGGETTI CON SINDROME DI WILLIAMS**

DR. RENATO BORGATTI

E-MAIL: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1
Neuropatologia

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

DESCRIZIONE

Le ricerche relative alla correlazione genotipo/fenotipo nei disordini evolutivi hanno evidenziato il contributo dei fattori genetici e neurobiologici alle variazioni dello sviluppo tipico e atipico. I disordini relativamente omogenei quali la Sindrome di Williams (WS) stanno offrendo una opportunità unica per chiarire le relazioni tra geni, cervello e comportamento; la delezione emizigote di circa 25 geni nella WS comporta infatti una cascata di conseguenze a livello fisico, cognitivo-comportamentale, affettivo e neurobiologico. Nel corso degli anni la linea di ricerca sulla WS nel nostro Istituto ha portato a diversi contributi pubblicati.

Dopo una fase in cui la ricerca a livello mondiale si è maggiormente concentrata sulle peculiarità del fenotipo cognitivo, l'interesse si sta portando anche sulle peculiarità del comportamento sociale nella SW (e su tutte le competenze di base sottese). Dagli studi sulle competenze cognitive sono emersi dati di rilievo per le conoscenze sullo sviluppo e sui correlati neurobiologici relativi alla processazione delle informazioni visuospaziali (ventral e dorsal streams), della working memory, delle funzioni esecutive, del linguaggio.

Le carenti capacità di integrazione configurale così come il deficit delle funzioni esecutive (frontali) è stato da noi ipotizzato essere alla base delle carenti capacità di riconoscimento delle emozioni e di anomalie nell'approachability (in questo caso con una dissociazione tra elemento percepito e comportamento conseguente); queste ipotesi sono in linea con lo sviluppo attuale della ricerca internazionale.

L'analisi del collegamento tra le competenze presenti e il comportamento è considerata centrale. La possibilità di correlare i dati sperimentali con le neuroimmagini (documentate sia alterazioni di organizzazione nelle fasi di sviluppo - che comportano un restraint parieto occipitale, una compromissione relativa dei nuclei della base ed una alterazione del funzionamento

cerebellare- che peculiarità neurobiologiche – come alterazione del funzionamento di amigdala, corteccia prefrontale, giro fusiforme e corteccia insulare) ha permesso sia di chiarire aspetti relativi al quadro sindromico specifico che di contribuire all'ampliamento delle conoscenze sull'organizzazione delle funzioni nello sviluppo "tipico". In particolare è stato possibile dimostrare come i punti di forza e debolezza del profilo cognitivo (e anche le dissociazioni) siano correlate a livello neurobiologico con l'organizzazione cerebrale. Il pattern neurologico nella WS è caratterizzato (Gagliardi et al 2007) dalla presenza di soft signs che rimandano al coinvolgimento delle strutture cerebrali; in particolare sono presenti segni lievi cerebellari e extrapiramidali. I primi diffusi nella popolazione e stabili nel tempo; i secondi meno diffusi ma con caratteristiche evolutive, presentandosi progressivamente con l'età anche se non in tutta la popolazione studiata.

Le abilità linguistiche sono sempre state considerate come un punto di forza nel disarmonico profilo cognitivo della sindrome di Williams.

Dai dati recenti emerge un quadro linguistico caratterizzato da una complessiva corrispondenza tra il linguaggio nella WS con l'età mentale, ad eccezione di: prestazione migliore nel linguaggio ricettivo, compromissione maggiore per linguaggio spaziale (ricettivo ed espressivo) e alterazioni a livello pragmatico (inizio appropriato delle conversazioni, scarsa coerenza). Secondo alcune ipotesi recenti nella WS ci potrebbe essere un'utilizzazione delle competenze linguistiche più orientata all'elemento sociale che a quello informazionale.

L'uso sociale del linguaggio potrebbe quindi essere compensatorio per la presenza di deficit nel riconoscimento più visivo (emozioni espresse dai volti, ad esempio). Anche il comportamento sociale nella WS è peculiare: pur essendo i soggetti WS fortemente socialmente orientati, sono presenti difficoltà sia nell'interazione che nel comportamento, con maggiore incidenza di problematiche psicopatologiche.

Obiettivo del progetto di ricerca è pertanto di proseguire nella linea di migliore definizione delle competenze neurocognitive e comportamentali nella Sindrome di Williams, sia per una migliore definizione della correlazione genotipo fenotipo, che per comprendere i processi sottesi, che per contribuire a delineare le traiettorie evolutive. In questa fase si ricercheranno le possibili correlazioni tra assetto neurologico e caratteristiche del linguaggio per evidenziare possibili dissociazioni e si approfondiranno le caratteristiche del comportamento adattivo e comunicazionale legate alle caratteristiche geno/fenotipiche.

La ricaduta dell'attività prevista è sia di tipo scientifico che clinico/riabilitativa. Gli aspetti comunicativi e sociali hanno infatti un immediato impatto sulla partecipazione e sulla qualità della vita.

Risultati e prodotti conseguiti

Il progetto mirava ad costruire ed applicare un protocollo per lo studio del linguaggio narrativo e spontaneo, rilevando organizzazione (micro e macro-linguistica), livello di efficacia comunicativa e di elaborazione concettuale, ponendolo in relazione sia con le altre competenze (in particolare visuospatiali e visuocostruttive) che con il comportamento.

Lo studio delle competenze narrative e dei suoi correlati neuropsicologici (Marini A., Martelli S., Gagliardi C., Fabbro F., Borgatti R., *Neuropsychological correlates of narrative language in Williams Syndrome*. *Journal of Neurolinguistics* - in press) ha utilizzato il protocollo messo a punto. Sono state indagate competenze cognitive generali, abilità visuospatiali, attenzione sostenuta, memoria a breve fonologica e lessicale e competenze grammaticali sia nel linguaggio espressivo che ricettivo. Le competenze narrative sono state indagate con un compito di descrizione di figure, per facilitare una produzione linguistica più comunicativa e fluente; la prestazione dei partecipanti WS è stata confrontata con quella di un gruppo di bambini con sviluppo tipico del linguaggio, con un matching per età mentale. Le competenze visuospatiali nel gruppo WS sono risultate compromesse (come estesamente riportato dalla letteratura). Il compito sperimentale narrativo ha evidenziato da una parte competenze linguistiche (fonologiche, lessicali e sintattiche) allineate all'età mentale nel gruppo WS, e dall'altra una minore efficacia nel compito narrativo per le misure che analizzavano la coerenza globale e la informatività lessicale. Questo dato ha permesso di evidenziare una dissociazione tra le competenze micro e macro linguistiche. Le caratteristiche del linguaggio narrativo non sono risultate correlate né alle competenze visuospatiali né all'attenzione visiva (come rilevato al Continuous Performance Test). Nonostante l'assenza di una correlazione significativa, è stato evidenziato un effetto del tipo di materiale proposto per il compito narrativo: la prestazione del gruppo WS è stata migliore con lo stimolo semplice (una singola vignetta) e peggiore con lo stimolo costituito da una sequenza di vignette: in questo caso la processazione richiesta è più complessa e sequenziale, comportando una attivazione maggiore anche a livello di working memory. I nostri dati suggeriscono la presenza di una difficoltà nell'estrazione di unità informative efficaci, più marcatamente quando siano implicate competenze spaziali ed esecutive. I risultati orientano alla presenza di un impairment selettivo nella WS nel dominio della processazione del discorso; il deficit specifico è più evidente quando sia richiesta una processazione ed organizzazione on line dell'informazione complessa rispetto alla semplice analisi percettiva. Rispetto alla relazione struttura funzione, questi elementi si pongono tra quelli che nella

letteratura sottolineano l'importante coinvolgimento delle strutture frontali nel determinare il pattern neurocognitivo nella WS (Eckert 2006, Rhodes 2009). Gli elementi raccolti contribuiscono ad una migliore conoscenza della organizzazione delle funzioni nella WS e nello sviluppo tipico. Hanno inoltre una ricaduta operativa nei contesti esistenziali dei bambini con WS, sia a livello scolastico che familiare che educativo, in quanto confermano la necessità di adattamento nelle modalità di proposta del materiale (visivo) e di guida nella organizzazione del discorso (coerenza, processazione online, organizzazione).

La seconda fase del progetto si è focalizzata sull'analisi del profilo comportamentale nei partecipanti con SW, con attenzione alla comunicazione, ai comportamenti auto ed eterodiretti, alle componenti ansiose e alle condotte antisociali. Nella WS, infatti, sono presenti contemporaneamente aumentato interesse negli aspetti/interazioni sociali e difficoltà nell'interazione (Meyer Linderberger et al 2006, Jarvinen- Pasley et al 2008). Per consentire un confronto con i dati già presenti in letteratura, abbiamo utilizzato un questionario da sottoporre ai genitori (DBC-P: Parent, Einfeld & Tonge, 1992) già usato con WS ed altre situazioni cliniche caratterizzate da Ritardo Mentale. La scala fornisce punteggi a tre diversi livelli: una misura globale di disturbo comportamentale (TBPS); i punteggi a sei sottoscale (Disruptive, Self-absorbed, Communication Disturbance, Anxiety, Autistic Related and Antisocial); i punteggi ai singoli item. La scala definisce inoltre un cutoff clinico oltre il quale il disturbo è considerato di gravità da moderata a grave. Sono stati inoltre raccolti ed analizzati i dati relativi a competenze cognitive generali, età e genere. Il progetto ha coinvolto 41 soggetti con SW con range di età fra i 5 e i 29 anni (divisi in due gruppi d'età il 43,9% dei soggetti erano sotto gli 8 anni, mentre i restanti 22 partecipanti avevano già compiuto 8 anni).

Come già descritto in letteratura (Einfeld et al., 2001) anche i nostri partecipanti hanno evidenziato rilevanti problemi comportamentali (più del 65% dei partecipanti hanno superato il cutoff). Il profilo comportamentale è risultato caratterizzato da una prevalenza di comportamenti ansiosi o di esternalizzazione in assenza di condotte antisociali. La nostra popolazione ha anche mostrato un'importante incidenza di impulsività e instabilità comportamentale. Abbiamo riscontrato un effetto di genere: le femmine hanno meno comportamenti di interiorizzazione e quindi sono meno problematiche in generale. Similmente un livello cognitivo più alto porta i nostri partecipanti con SW a comportamenti di maggiore esternalizzazione o per lo meno ad una tendenza di minore interiorizzazione.

I nostri dati sono stati valutati in prospettiva evolutiva ma sono stati rilevati in modo trasversale; non possono quindi essere direttamente confrontati con quelli di Einfeld et al, 2006, che derivano da un studio di follow up. Cionono-

stante, come da loro segnalato anche nella nostra popolazione SW i comportamenti di autoassorbimento risultano legati al QI (maggiori con minori competenze cognitive generali) e all'età (decescenti all'aumentare dell'età). I comportamenti di tipo internalizzato sono risultati nel nostro campione meno frequenti nelle femmine che nei maschi. L'impatto delle problematiche ansiose tende a decrescere con l'età. Dall'analisi dei singoli item, inoltre, 8 singoli item sono risultati come presenti in almeno il 75% dei questionari. In particolare gli item relativi a disturbi di attenzione e distrazione sono risultati frequenti indipendentemente dall'età, confermando così dati di letteratura sulla presenza importante di ADHD nella SW (Leyfer et al., 2006; Facchino et al., 2009). Anche i comportamenti di ricerca di attenzione e di segni di affetto risultano comuni a tutte le età. Iperattività e eccessi di collera tendono a diminuire con l'età, probabilmente a causa di un effetto di maturazione graduale: questi comportamenti generalmente declinano in adolescenza (Einfeld et al., 2001). In una prospettiva cognitivo/comportamentale, i problemi di esternalizzazione più evidenti nel gruppo dei soggetti di età più elevata potrebbe essere interpretato come il risultato di un conflitto tra una spinta prosociale a componente compulsiva (per esempio, le difficoltà nell'inibire i comportamenti prosociali anche quando notoriamente inappropriati) ed un grado variabile di consapevolezza dell'adeguatezza alle richieste ambientali. In questa prospettiva, competenze cognitive migliori potrebbero giocare un ruolo importante. Si potrebbe ipotizzare una più specifica componente per disturbi principalmente esternalizzanti in età più avanzata legata ad una compromissione crescente nelle funzioni esecutive e di controllo. Anomalie neurologiche più generali nel riconoscimento facciale così come danni nella percezione e fissazione sono ben documentate e sono probabilmente legate a pattern neuroanatomici e neurofunzionali (si veda Järvinen-Pasley et al., 2008 per una revisione). Per quanto riguarda le vie neurochimiche, nel determinare l'aumento di comportamenti sociali ed una diminuzione della paura e dell'aggressività nei modelli animali, si è ipotizzato un ruolo della serotonina per il GTF2IRD1 - un fattore di trascrizione coinvolto nella microdelezione della SW (Young et al. 2008). Un'altra ipotesi riguarda la possibilità di un danneggiamento delle vie dopaminergiche nella SW (Bowden et al., 1997; Power et al., 1997; Gagliardi et al., 2007).

In conclusione, il fenotipo comportamentale nel WS non sembra essere stabile nel tempo come precedentemente descritto da Udwin et al., 1998 e soprattutto non privo di rilevanti problematiche.

Gli elementi raccolti consentono di ampliare le conoscenze relative alla relazione tra fenotipo comportamentale (comportamento, psicopatologia) e genotipo e tra struttura e funzione. Rilevante inoltre è la ricaduta clinico/riabilitativa per la stretta connessione tra comportamento e partecipazione.

Prodotti

Marini A., Martelli S., Gagliardi C., Fabbro F., Borgatti R., Neuropsychological correlates of narrative language in Williams Syndrome, *Journal of Neurolinguistics*, 23(2):97-111

Gagliardi C., Martelli S., Tavano A., Borgatti R. "Social behaviour and social adjustment: behavioural features of Italian infants and young adults with Williams Syndrome" (submitted to *Journal of Intellectual Disability Research*)

Attività previste

Nel corso dell'anno verranno raccolti e analizzati:

1. dati relativi alle competenze linguistiche e assetto neurologico da confrontare con assetto neurocognitivo con l'obiettivo di utilizzare i segni funzionali sottocorticali e cerebellari come indice per la definizione di pattern di associazione cervello/funzione nel tempo ancora non specificati. In particolare si prevede di reclutare tra i pazienti regolarmente seguiti nel corso del follow up un numero consistente (circa 25) soggetti WS di diverse fasce di età che effettueranno:

- valutazione competenze cognitive generali (e assessment età mentale (scala Stanford Binet)
- esame neurologico integrato con particolare attenzione alla ricerca di soft signs neurologici (come in Gagliardi et al 2007) sia piramidali che cerebellari che extrapiramidali
- assessment neuropsicologico con particolare attenzione alle competenze spaziali/costruttive- Block Design – scala Wechsler e VMI (Visual Motor Integration test) – ed esecutive (fluenza fonologica e semantica: FAS e CAT, Riva et al 2000)
- assessment linguaggio: linguaggio ricettivo: PPVT – R (Peabody Picture Vocabulary test revised); Token test. Linguaggio espressivo: Boston Naming Test; Ripetizione di frasi
- assessment memoria: breve termine verbale (digit span – scala Wechsler) e spaziale (Corsi span)

I dati raccolti verranno analizzati e correlati. I segni neurologici minori (soft signs) verranno quindi utilizzati come indici di deficit neurofunzionali che permettano di trovare indicatori specifici nel comportamento atipico nelle diverse fasce di età. Ipotizziamo infatti che alla diversa distribuzione (inter soggetti e a diverse età) dei soft signs neurologici corrisponda una diversità di profilo neurocognitivo ed in particolare linguistico. Se l'ipotesi fosse confermata dai

dati sarebbe possibile infatti individuare sia peculiarità dell'organizzazione e sviluppo delle funzioni nella WS che fornire nuovi dati evolutivi relativi allo sviluppo delle funzioni.

2. dati relativi alle problematiche comportamentali, con particolare attenzione alle funzioni adattive e alla comunicazione. Verrà proposta, oltre al questionario DBC-P, la scala Vineland. La scala è costruita dalla risposte ottenute dai genitori (o caregivers) ad una intervista strutturata; le risposte ottenute vengono poi riunite in clusters e riportate a domini: competenze ricettive, espressive; abilità di scrittura; autonomia personale, domestica e sociale (comunità); relazioni interpersonali; gioco e tempo libero; regole sociali; abilità grosso e fini motorie. Obiettivo è sia la descrizione delle caratteristiche del profilo adattivo che la correlazione con le competenze di base (cognitive generali, linguistiche, motorie e spaziali). Ai partecipanti WS reclutati tra i pazienti seguiti in follow up, di diverse fasce di età, verranno quindi proposti:

- assessment competenze cognitive generali (scala Stanford Binet – età mentale)
 - Scala Vineland (ai genitori o care giver)
 - esame neurologico (per correlazione con dati relativi alle competenze grosso e fino motorie)
 - VMI (per verifica di interferenza delle difficoltà di integrazione costruttiva).
- Ipotizziamo che i domini della Comunicazione e della Socializzazione risultino relativi punti di forza nelle persone WS, mentre le autonomie (personali e domestiche) e le competenze grosso e soprattutto fino motorie siano invece punti di debolezza. A questo potrebbe corrispondere un analogo andamento alle prove cognitive e del pattern neurologico. Ipotizziamo inoltre un miglioramento delle competenze adattive in funzione dell'età cronologica e mentale. La possibile ricaduta è prevedibile sia a livello scientifico (migliore conoscenza del profilo e interrelazioni tra le competenze) che come base per processi riabilitativi mirati a sostenere la partecipazione.

LE BASI NEUROBIOLOGICHE DELL'INTERAZIONE PRECOCE MADRE-BAMBINO: STUDIO CLINICO, NEUROCHIMICO, NEUROFISIOLOGICO E DI NEUROIMAGING FUNZIONALE

DR. ROSARIO MONTIROSSO

E-MAIL: ROSARIO.MONTIROSSO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Struttura complessa di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale, Ospedale "A. Manzoni" di Lecco

DESCRIZIONE

La prematurità rappresenta una condizione di stress emotivo significativo sia per i bambini che per le loro madri, con effetti a breve e medio termine. Nel bambino le fonti di stress sono dovute non solo alla precoce separazione dalla madre, ma anche all'esposizione a stimoli ambientali e alle procedure di assistenza medico-infermieristica che producono effetti significativi sulla reattività fisiologica e comportamentale del bambino (Annad & Scalzo, 2000). Sul piano dell'interazione madre-bambino la prematurità si associa ad un minore coinvolgimento sociale: i bambini pretermine manifestano minori segnali espressivi e una più ridotta reattività alle comunicazioni materne (Crawford, 1982). La nascita prematura rappresenta una fonte di stress anche per le madri. Oltre ai vissuti traumatici legati alla nascita di un bambino "diverso" da quello sperato ed idealizzato, le madri sono soggette alle preoccupazioni e alle ansie associate agli andamenti della condizione clinica del figlio. Le madri dei bambini prematuri riportano infatti livelli più alti di depressione rispetto alle madri di bambini nati a termine (Miles, Holditch-Davia, Schwartz & Scher, 2007; Montiroso et al., 2009). Tale condizione emotiva materna si associa spesso ad una minore qualità degli scambi emozionali: le madri mostrano un minore contatto fisico con i figli e minore numero di sguardi e di vocalizzazioni (Malatesta, Grigoryev, Lamb, Galvin & Culver, 1986). Globalmente le condizioni avverse in cui si sviluppano i primi scambi madre-bambino prematuro predispongono ad un'alterazione della sincronia tra i due partner (Feldman, 2006). Poiché diversi studi hanno evidenziato come la capacità di coordi-

nazione costituisca la base per un'adeguata qualità della relazione madre-bambino con effetti a lungo termine sullo sviluppo socio-emotivo e le capacità di autoregolazione del bambino, indagare gli effetti dello stress associato alla prematurità permetterebbe di individuare fattori protettivi che consentano di ridurre gli esiti negativi che questa può avere sulla relazione primaria e quindi sullo sviluppo socio-emozionale del prematuro. Studi recenti hanno documentato infatti come l'alterazione dei ritmi biologici e della reattività fisiologica rilevabili nel bambino prematuro nel corso della sua ospedalizzazione sia connessa ad una ridotta sincronizzazione madre-bambino rilevata a tre mesi di vita (Feldman, 2006). Date inoltre le evidenze relative alla condizione emotiva materna alcune di queste modificazioni potrebbero, non solo essere rilevabili sul piano neurofisiologico, ma addirittura riguardare l'espressività di alcuni pattern neurocerebrali. La presente Ricerca Corrente si propone l'obiettivo di indagare la relazione precoce madre-bambino in una situazione di rischio evolutivo, qual è la nascita pretermine, da una prospettiva interazionale, neurofisiologica e di neuroimaging e verrà articolata, lungo i tre anni previsti, in due studi distinti e successivi aventi i obiettivi specifici. L'obiettivo primario dello Studio I è indagare il nesso tra ritmi biologici neonatali e ritmi interattivi precoci madre-bambino tenendo in debito conto la condizione di stress materno. In particolare valutare possibili differenze tra il gruppo di pretermine a basso rischio ed il gruppo di pretermine ad alto rischio attraverso parametri biologici e fisiologici in fase neonatale e a tre mesi di vita. Si ipotizza che il differente grado di stress sperimentato alla nascita tra i due gruppi di prematuri abbia un peso proporzionale sulle successive probabili difficoltà nell'interazione con la madre e nei livelli di stress così come nelle capacità di autoregolazione. Ci si attende in generale che la condizione di prematurità evidenzii delle alterazioni sul piano relazionale e fisiologico sia a breve che a lungo termine e che tali difficoltà siano più marcate nei bambini prematuri ad alto rischio. È ipotizzabile inoltre trovare alterazioni nei ritmi fisiologici della madre in quanto la prematurità del figlio rappresenta una fonte di stress per le madri. Anche nel caso delle madri lo scopo sarà di osservare se vi siano delle differenze in virtù del grado di prematurità del figlio e quindi del diverso livello di stress sperimentato dalle stesse nel periodo postnatale. L'obiettivo dello Studio II è la valutazione delle differenze eventualmente esistenti tra le madri del gruppo di pretermine e le mamme di bambini nati a termine nei pattern di attivazione cerebrale a tre mesi di vita del bambino. Poiché è stato evidenziato che gli esiti neuroevolutivi e relazionali nel bambino sono associati al grado di prematurità e ipotizzando che il livello di stress materno possa essere diverso a seconda della complessità del quadro clinico, nello Studio I saranno indagati due gruppi di bambini prematuri, ad alto e a basso rischio e le loro madri. Dato lo specifico obiettivo, nello Studio II invece saranno prese

in esame come gruppo di controllo bambini nati a termine e le loro madri.

Risultati e prodotti conseguiti

In seguito ad un'ampia disamina della letteratura, nel corso dell'anno, è stato messo a punto il protocollo della ricerca e le relative procedure sulla base degli obiettivi prefissati. Sono stati presi contatti con l'ente coinvolto nella ricerca ossia l'ospedale "A. Manzoni" di Lecco al fine di effettuare dei sopralluoghi presso la Struttura Complessa di Neonatologia e la Terapia Intensiva Neonatale (TIN). Sono stati inoltre affrontati alcuni problemi di ordine tecnico, in particolare è stato necessario contattare i product specialist di Philips Healthcare per ottenere le autorizzazioni ed il supporto necessario per esportare i segnali ECG dei neonati pretermine ricoverati presso la TIN. Sono state eseguite registrazioni di prova dell'ECG del bambino e della madre nel corso dell'interazione diadica secondo i criteri del paradigma di osservazione strutturata still-face, con prelievo di campioni di cortisolo di entrambi i partner, pre e post procedura. Effettuata una registrazione video di prova presso la TIN di Lecco al fine di verificare la collocazione e le modalità di registrazione del ciclo sonno-veglia.

Attività previste

Nello studio I verrà reclutato un campione di bambini prematuri che soddisfino i criteri previsti dal protocollo di ricerca. Nella prima parte verranno quindi effettuate, nel corso del ricovero in terapia intensiva neonatale, osservazioni del ciclo sonno-veglia, registrazione ECG e prelievo di campioni di cortisolo. A tre mesi si utilizzerà il paradigma Still-Face che prevede la temporanea sospensione della comunicazione diadica madre-infante, consentendo l'esposizione del bambino ad un evento socio-emozionale moderatamente stressante. Oltre alla videoregistrazione dell'interazione madre-bambino ed alla simultanea acquisizione degli ECG (sia dell'infante che della madre), da entrambi i membri della diade verranno prelevati cinque campioni di saliva. Il tono vagale cardiaco sarà valutato attraverso l'Aritmia Sinusale Respiratoria, calcolata implementando l'algoritmo brevettato da Porges (1985) in un software appositamente sviluppato. Le concentrazioni di cortisolo salivare saranno quantificate secondo la metodica EIA (Enzyme Immuno Assay). Tali osservazioni verranno correlate con i parametri fisiologici monitorati nel corso del ricovero e descritte sopra.

SVILUPPO DEI PROCESSI DI ATTENZIONE E MEMORIA IN NEONATI SANI E NATI IN CONDIZIONI DI RISCHIO EVOLUTIVO

DR. ROSARIO MONTIROSSO

E-MAIL: ROSARIO.MONTIROSSO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1
Neuropatologia

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

Collaborazioni

Child Development Unit, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Unità Operativa di Pediatria, Ospedale Sacra Famiglia, Erba (CO)

DESCRIZIONE

L'obiettivo principale di questa ricerca è quello di indagare le capacità mnestiche infantili in una situazione sociale stressante e connotata dal punto di vista emozionale (per i dettagli del protocollo si veda la relazione Ricerca Corrente 2007). Lo studio valuta la reattività fisiologica, oltre che comportamentale, di bambini di quattro mesi di vita nel corso di una situazione interattiva che prevede una fase di non-responsività materna (paradigma Still-Face).

In particolare, vengono presi in considerazione due indicatori dello stress: il primo collegato alla risposta del sistema nervoso autonomo parasimpatico (tono vagale cardiaco, valutato attraverso l'aritmia sinusale respiratoria, RSA); il secondo connesso all'attività del sistema neuroendocrino (reattività dell'asse ipotalamico-pituitario-adrenocorticale (HPA), valutata attraverso la concentrazione del cortisolo salivare). Il disegno sperimentale utilizzato nella presente ricerca prevedeva la suddivisione delle diadi madre-bambino partecipanti allo studio in due gruppi: a) un gruppo sperimentale (gruppo A), costituito da diadi che hanno partecipato a due sessioni di Still-Face (rispettivamente a 4 mesi e 4 mesi e 15 giorni di età del bambino), e b) un gruppo di controllo (gruppo B), le cui diadi hanno partecipato ad un'unica sessione quando il bambino aveva un'età di 4 mesi e 15 giorni.

Questo disegno sperimentale, prevedendo l'esposizione del gruppo A ad un evento interattivo stressante e alla ripetizione dello stesso a distanza di due settimane permette di valutare le capacità infantili di memorizzazione dell'esperienza vissuta, rispetto al gruppo B che non ha un precedente esperienza

dell'evento stressante.

Risultati e prodotti conseguiti

Complessivamente, dall'inizio della RC sono state video-registrate le interazioni di 38 diadi madre-bambino del gruppo A e 40 diadi del gruppo B, per un totale di 116 sessioni valide. In particolare, nel corso del 2009 sono state video-registrate le interazioni di 63 diadi madre-bambino (20 del gruppo A e 23 del gruppo B). Oltre a queste, 7 sessioni non sono state completate a causa del pianto inconsolabile del bambino, e le video-registrazioni di 6 diadi del gruppo A sono state escluse dalle successive analisi perché non hanno poi partecipato alla sessione 2 per motivi familiari e/o di salute del bambino. Per ogni video-registrazione valida, sono state analizzate le differenze individuali manifestate dal bambino a livello fisiologico (reattività del tono vagale cardiaco e variazione della concentrazione di cortisolo salivare) a causa dell'evento stressante indotto durante la procedura Still-Face.

In linea con le analisi preliminari condotte nel corso del 2008, i bambini (sia del gruppo sperimentale che di controllo) sono stati suddivisi in funzione della risposta fisiologica individuale, sia per quanto riguarda il tono vagale cardiaco, che la concentrazione di cortisolo salivare. In particolare, per quanto riguarda l'RSA, gli infanti che esibivano una diminuzione dell'attività vagale in risposta allo stress indotto ("Soppressori") sono stati separati da coloro che, invece, presentavano una reazione opposta ("Non-Soppressori").

Per quanto riguarda la risposta dell'asse HPA, tutti i bambini sono stati classificati in base al fatto che reagissero all'evento stressante con un aumento ("Incrementatori") oppure una riduzione ("Decrementatori") della concentrazione di cortisolo salivare. I risultati complessivi, in linea con quelli ottenuti dai dati del 2008, mostrano che gli infanti che sperimentavano la procedura Still-Face per la prima volta (gruppo A sessione 1 e gruppo B) esibivano una reattività fisiologica analoga, sia per quanto riguarda l'andamento dell'RSA durante la procedura Still-Face, che i valori di picco della concentrazione di cortisolo salivare post interazione madre-bambino. Invece, gli infanti che ripetevano la prova per la seconda volta, ovvero che erano stati precedentemente esposti alla medesima situazione di stress interattivo (gruppo A sessione 2), presentavano andamenti di entrambe le risposte fisiologiche differenti da quelle osservate precedentemente (sessione 1). Questa diversa reattività fisiologica potrebbe essere ricondotta ad una qualche forma di memorizzazione della situazione socio-emozionale sviluppato da questi bambini. Inoltre, la memoria dell'esperienza precedente potrebbe influire diversamente sulla risposta fisiologica dell'infante, in funzione delle peculiarità individuali di reattività e regolazione sia del sistema nervoso para-

simpatico (tono cardiaco del nervo vago) che dell'asse HPA (concentrazione di cortisolo salivare).

Attività previste

Nel corso del 2010 verranno ampliati ulteriormente i due campioni in modo da bilanciare la numerosità dei due gruppi. Pertanto, si prevede che occorrerà reclutare almeno altre 20 diadi madre-bambino per gruppo, per un totale di 60 nuove osservazioni valide (20+20 del gruppo A e 20 del gruppo B). Supponendo un tasso di drop-out del 10% circa, sarà opportuno un sovracampionamento tale da ottenere almeno 65-70 osservazioni complessive. Durante il 2010, sarà avviata la codifica micro-analitica (secondo per secondo) di tutte le video-registrazioni degli infanti e delle loro madri (in particolare di quelle acquisite nel corso degli anni passati), rispetto al loro livello di coinvolgimento reciproco, utilizzando il sistema di codifica Infant and Caregiver Engagement Phases (ICEP, Weinberg & Tronick, 1999). Inoltre, per i nuovi soggetti video-registrati, verranno quantificate ed analizzate le rispettive variazioni dell'attività cardio-respiratoria (tono del nervo vago) tramite il nostro software e le concentrazioni di cortisolo salivare secondo la metodica EIA (Enzyme Immuno Assays), così come è stato fatto nel corso del 2008 e del 2009. Infine, l'analisi comportamentale sarà associata a quella della reattività fisiologica: la combinazione dei due aspetti permetterà una valutazione complessiva più puntuale della risposta allo stress e dei processi mnemonici del bambino piccolo.

LE COMPETENZE DI DEGLUTIZIONE E DI ALIMENTAZIONE NEL BAMBINO PICCOLO (0-12 MESI) CON PROBLEMI NEUROLOGICI: DALLA VALUTAZIONE AL TRATTAMENTO

SIG.A CINZIA GENTILI

E-MAIL: CINZIA.GENTILI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 1
Neuropatologia

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

DESCRIZIONE

Le problematiche deglutorie e alimentari sono molto frequenti in bambini con disabilità neurologica grave e complessa. Non esistono univoci dati epidemiologici anche se, in alcune categorie ad alto rischio (es. in bambini portatori di PCI spastica) la disfagia faringea è stimata nel 80% dei casi (Bader CA, Niemann G, 09). Laddove l'interessamento neurologico è a carico della coordinazione, respirazione e deglutizione, si riscontra una disfagia faringea interessante il crocevia estremamente critico tra la via respiratoria e la via alimentare; eventi critici a carico di tale incrocio sono fenomeni di inalazione diretta di saliva e di alimenti nelle vie aeree con possibile determinazione di disfunzioni respiratorie anche gravi, tali fenomeni possono peggiorare in presenza di una MRGE (Malattia da Reflusso Gastro Esofageo). Allorquando i riflessi di protezione delle vie aeree non siano presenti ed efficaci, si possono verificare silenti aspirazioni anche minime ma continue, determinanti cronicità respiratorie.

Tali problematiche possono essere riscontrate in due momenti precisi dello sviluppo del bambino: alla nascita o al momento dello svezzamento .

Alla nascita il quadro risulta eclatante, maggiormente severo ed invalidante perché viene a mancare una funzione primaria caratterizzata da una perfetta coordinazione tra suzione, deglutizione e respirazione.

Al momento dello svezzamento, invece, intorno ai 6-8 mesi, le difficoltà di gestione di consistenze e strumenti diversi evidenziano la mancata o rallentata svolta anatomica/neurologica tipica di questa età. In questo caso, le problematiche deglutorie ed alimentari risultano meno gravi ma comportano la necessità di attuare una serie di misure adattive finalizzate a rendere il pasto sicuro ed efficace.

Spesso alterazioni della deglutizione rimangono misconosciute finché le fre-

quenti infezioni respiratorie e/o l'ipoaccrescimento inducono ad indagare in modo approfondito tale funzione. La diagnosi tardiva e/o la complessità del quadro neurologico però non sempre permettono di poter attuare interventi riabilitati al fine di poter modificare modalità alimentari inadeguate nei parametri di sicurezza ed efficacia per cui, nei casi estremi, non restano che presidi chirurgici (es. posizionamento di PEG).

Le difficoltà sopra descritte sono una condizione patologica frequentemente riscontrata nei piccoli pazienti ricoverati presso l'U.O. di Neuroriabilitazione 1, tale condizione rende necessario definire un approccio valutativo che includa, oltre che una presa in carico multidisciplinare, la realizzazione di un protocollo di osservazione delle competenze alimentari e la definizione di percorsi di intervento precoce con coinvolgimento dei genitori.

Risulta pertanto fondamentale una valutazione il più possibile precoce dei bambini con danno neurologico per individuare quanti presentano una incompetenza sul piano deglutorio ed alimentare al fine di applicare le più opportune strategie di intervento quali la messa in atto di norme dietetico-alimentari, posturali e di presidi che garantiscano una idratazione e una alimentazione adeguata e sicura.

Gli studi sull'efficacia del trattamento logopedico sul bambino neurologico sono ridotti, tuttavia affermano l'importanza delle stimolazioni orali al fine del miglioramento della qualità della vita sia in termini di gestione delle secrezioni che nelle abilità di nutrizione (Grosso E. GISD 2007).

Le evidenze scientifiche sostengono che le stimolazioni orali precoci evidenziano un miglioramento ed una veloce acquisizione del pattern suzione/deglutizione/respirazione e inducono ad ipotizzare che tale pattern non sia influenzato solo dalla maturazione neurofisiologica ma che possa migliorare anche con la pratica (Fucile S, Gisel EG, 05; Grosso E. 2007).

Gli obiettivi globali dell'intervento precoce pertanto sono: migliorare la qualità di vita del bambino e della sua famiglia, migliorare la stabilità delle vie aeree, ridurre il rischio di aspirazione e ottimizzare la nutrizione in termini di qualità e di idratazione, indipendentemente dal tipo di ingresso attuato.

Il presente progetto di ricerca si pone i seguenti obiettivi:

- messa a punto di un protocollo di valutazione clinico-funzionale finalizzato alla valutazione delle abilità prealimentari in bambini portatori di presidi di alimentazione alternativa ed alimentari in bambini alimentati per os.
- messa a punto di un piano di trattamento riabilitativo in fase acuta o post-acuta compatibile con l'età, lo stadio di sviluppo e il quadro clinico che preveda interventi diretti e/o indiretti quali, stimolazioni nutritive/non nutritive, indicazioni dietetiche (apporto nutrizionale e consistenze), indicazioni

posturali e modalità facilitanti finalizzate al recupero/sviluppo delle competenze associate alla deglutizione/alimentazione.

Attività previste

- Revisione della letteratura
- Definizione di un protocollo di valutazione funzionale finalizzato alla valutazione delle abilità deglutitorie, prealimentari ed alimentari sia in bambini che si alimentano per os che in bambini portatori di presidi di alimentazione alternativa
- Reclutamento della casistica con coinvolgimento di tutti i bambini con un'età compresa tra 0 e 12 mesi affetti da una patologia neurologica coinvolgente il SNC ricoverati nel reparto di NR1
- Applicazione del protocollo di valutazione con follow-up a distanza di tre, sei e 12 mesi al fine di valutarne le competenze
- Definizione di un piano di trattamento riabilitativo in fase acuta o post-acuta compatibile con l'età, lo stadio di sviluppo e il quadro clinico comprensivo di interventi diretti e/o indiretti quali, stimolazioni nutritive/non nutritive, indicazioni dietetiche (apporto nutrizionale e consistenze), indicazioni posturali e modalità facilitanti .
- Partecipazione a convegni e congressi.

VALUTAZIONE MEDIANTE FMR DI PAZIENTI EMIPLEGICI PRE E POST TRATTAMENTO CON CONSTRAINT THERAPY

DR.SSA ANNA CARLA TURCONI

E-MAIL: ANNACARLA.TURCONI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione Neuromotoria e
Neuropsicologia Funzionale

Periodo di svolgimento

2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS S. Raffaele – Milano - Centro Analisi Biosegnali

DESCRIZIONE

La penalizzazione terapeutica dell'arto conservato, chiamata constraint induced therapy (CIT), viene definita come una terapia che abbina l'allenamento intensivo di un arto superiore leso dopo danno neurologico centrale alla penalizzazione funzionale dell'uso dell'arto sano.

Nel bambino con Paralisi Cerebrale Infantile l'utilizzo e l'efficacia della CIT sono stati dimostrati da studi pilota dal 2000 in poi: Willis (2002), Eliasson (2003), Taub (2004), Eliasson (2005), Charles (2006).

Attualmente non esistono studi neurofisiologici o di neuroimaging effettuati sul bambino che documentino le modificazioni indotte dalla riorganizzazione neurologica post terapia costrittiva.

Obiettivo dello studio è quello di documentare come i miglioramenti funzionali possano correlare con la riorganizzazione funzionale cerebrale.

Un numero limitato di casi (da 8 a 18 casi) di età compresa tra i 2 e i 14 anni affetti da esiti di emiparesi connatale e da danno acquisito è stato e sarà reclutato nello studio. È previsto il trattamento di constraint therapy secondo un protocollo standardizzato.

Prima del trattamento ed al termine dello stesso è prevista fMR per comprendere i pattern di attivazione cerebrale durante l'esecuzione di un compito specifico.

I risultati attesi riguardano l'efficacia del trattamento da documentarsi non solo con risultati funzionali, ma anche con le neuroimmagini, con modificazioni delle aree specifiche cerebrali ed eventualmente delle vie corticospinali.

Nella sede di Bosisio Parini sono stati già studiati 9 pazienti; verranno reclutati altri soggetti (max 6 soggetti) di età compresa tra 5 e 14 anni affetti da esiti di emiplegia congenita o acquisita.

I pazienti verranno sottoposti ad esame di Risonanza Magnetica Funzionale (fMR) con compito motorio passivo (chiusura e apertura mano) e a riposo e a trattografia per studio delle vie corticospinali mediante tecnica di Diffusion Tensor Imaging (DTI).

Saranno quindi sottoposti a trattamento con constraint therapy con contenzione dell'arto sano ed allenamento intensivo dell'arto plegico secondo il seguente programma:

- costrizione mantenuta 3 ore al giorno, 7 giorni la settimana.
- accessi alla terapia (intensiva) ai centri 3 volte la settimana per 3 ore di cui 1,30 di terapia, 1,30 di lavoro per la famiglia.
- periodo complessivo della CTI: 2 mesi.

Protocollo di valutazione: (T0):

- raccolta di dati anamnestici e clinici circa la compromissione motoria;
- esame obiettivo e neurologico completo, valutazione della stereognosi e Test della Figura Umana a partire dai 4 anni;
- Gross Motor Function Measure (GMFM);
- scala di sviluppo: Griffith24 fino ai 5 anni e scale Wechsler (Wippsi25 fino a 7 anni e Wisch-R26 successivamente);
- Quality of Upper Estremità Skills Test (QUEST) e la scala Besta;
- scala di stress familiare (Parenting Stress Index) compilata da parte dei genitori.
- Child Behavior Checklist.

Alla fine del trattamento (T1) e dopo 6 mesi (T2) il paziente sarà nuovamente sottoposto alla stessa indagine neuroradiologica che era stata effettuata prima del trattamento e delle valutazioni funzionali sopra descritte.

Nelle sedi di Conegliano e Pasian di Prato si effettueranno le stesse attività descritte per Bosisio Parini. Si prevede di reclutare un massimo di 3 pazienti. Il trattamento verrà effettuato presso la sede mentre la fMR sarà effettuata presso il S. Raffaele.

Risultati e prodotti conseguiti

Ad oggi (anno 2008-2009) sono stati reclutati nove pazienti:

- Paziente numero 1, (9 aa e 11 mesi), con diagnosi di emisindrome facio-brachio-crutale sinistra, deficit neuropsicologici, esiti di ictus ischemico emisferico destro in cardiopatia congenita, occorso in data 09/12/2007;

- Paziente numero 2, (10 aa e 11 mesi), con diagnosi di emiparesi sinistra con maggior compromissione dell'arto superiore e deficit neuropsicologici in esito di trauma cranico occorso in data 08/04/2007;

- Paziente numero 3, (12 aa e 11 mesi), con diagnosi di emisindrome motoria destra, afasia non fluente in paziente affetto da ictus cerebri ischemico corticale sottocorticale e profondo fronto-temporale sinistro criptogenetico, occorso in data 5/12/2007.

- Paziente numero 4, (13 anni) lieve emisindrome destra, difficoltà neuropsicologiche e linguistiche in paziente con esiti di asportazione di angioma cavernoso fronto-temporo-parietale sinistra.

- Paziente numero 5, (11 anni): sfumata emisindrome facio-brachio-crutale destra, tremore prevalente agli arti superiori, exotropia occhio destro, deficit neuropsicologici e del linguaggio in esiti di grave trauma cranico (ottobre 2008).

- Paziente numero 6, (11 anni); stroke ischemico capsulo lenticolare sinistro, emiparesi destra, cardiomiopatia dilatativa in esito di possibile IMA o possibile miocardite. Probabile sindrome da anticorpi anti-fosfolipide in corso di accertamento.

- Paziente numero 7, (8 anni); trauma da incidente stradale con quadro di tetraparesi a maggiore compromissione sinistra, atassia, dismetria, deficit neuropsicologico e linguistico.

- Paziente numero 8, (8 anni): emisindrome sensitivo-motoria facio-brachio-crutale destra e afasia non fluente in soggetto con esiti di ictus cerebri (occorso il 5/06/2009)

- Paziente numero 9, (5 anni); parto distocico, a un mese di vita presenta grave crisi comiziale; alla RMN si documenta lesione ischemica emisferica sinistra. Emiplegia destra.

I pazienti sono stati sottoposti ad un protocollo di valutazione iniziale (T0) che include:

- Raccolta di dati anamnestici e clinici indicanti, oltre che i principali dati anagrafici, il livello di gravità di compromissione motoria, la presenza di disabilità aggiuntive e/o patologie completanti il quadro di comorbidità complessivo;
- Esame obiettivo e neurologico completo, comprendente anche la valutazione della stereognosi e dello schema corporeo, attraverso il Test della Figura Umana;
- Valutazione delle abilità motorie globali con la Gross Motor Function Measure (GMFM) ·Valutazione della funzionalità dell'arto superiore attraverso la scala Quality of Upper Estremità Skills Test (QUEST)

- Valutazione della funzionalità dell'arto superiore attraverso la scala Besta
- Scala di stress familiare (Parenting Stress Index) e scala delle autonomie redatta dall'Istituto Besta e compilata da parte dei genitori.

I pazienti hanno poi eseguito una Risonanza Magnetica Funzionale (fMR) presso l'IRCCS San Raffaele ed hanno iniziato il trattamento con constraint therapy secondo il programma descritto in precedenza, al termine del quale sono stati sottoposti ad una seconda Risonanza Magnetica Funzionale (fMR) presso l'IRCCS San Raffaele ed hanno eseguito le rivalutazioni al T1.

I pazienti hanno eseguito una terza Risonanza Magnetica Funzionale (fMR) presso l'IRCCS San Raffaele a distanza di sei mesi dall'inizio del trattamento ed hanno eseguito le rivalutazioni al T2 che hanno evidenziato un miglioramento globale per quanto concerne le abilità motorie globali e la funzionalità dell'arto superiore leso.

I risultati riferiti agli esami di fMR saranno disponibili solo alla fine dello studio in quanto dovranno essere raffrontati tra di loro.

L'efficacia di tale trattamento risulta essere influenzata in larga misura dalla collaborazione dei bambini nello svolgimento delle attività proposte, spesso frustranti e ripetitive.

È altresì indispensabile il supporto delle famiglie: i genitori dei pazienti si sono dimostrati partecipi e attivi durante tutta la durata del protocollo suggerendo modalità di reclutamento dell'arto in varie attività e hanno dedicato molto del loro tempo libero all'interazione di gioco coi loro figli, motivandoli e spronandoli.

I bambini sono riusciti ad integrare l'arto superiore plegico nelle attività quotidiane e hanno anche migliorato positivamente tempi di attenzione e modalità di partecipazione alle proposte.

Anche la soddisfazione delle famiglie è complessivamente positiva, pur considerando il trattamento oneroso e faticoso; per quanto riscontrato fino ad ora, i genitori si dichiarano abbastanza soddisfatti di come il bambino utilizza la mano al termine del trattamento, dell'autonomia dello stesso e delle cose che sa fare. Parere positivo anche riguardo alla variazione del comportamento del bambino e alla propria capacità di saper proporre attività utili.

Attività previste

Per l'anno 2010 verrà valutata una casistica di altri 6 pazienti di età compresa tra 5 e 14 anni affetti da esiti di emiplegia dovuta a eventi anossici-ischemici-vascolari pre-peri natali (danno congenito) o anossici-ischemici-vascolari-traumatici post-natali (danno acquisito).

I pazienti verranno sottoposti ad esame di Risonanza Magnetica Funzionale (fMR) con compito motorio passivo (chiusura e apertura mano) e a riposo e

a trattografia per studio delle vie corticospinali mediante tecnica di Diffusion Tensor Imaging (DTI).

I pazienti collaboranti non necessiteranno di sedazione che sarà invece effettuata nei bambini più piccoli.

I pazienti reclutati saranno quindi sottoposti a trattamento con constraint therapy che prevede la contenzione dell'arto sano e l'allenamento intensivo dell'arto plegico secondo il seguente programma:

- la costrizione viene mantenuta per 3 ore al giorno per 7 giorni la settimana.
- gli accessi alla terapia (intensiva) ai centri sono di 3 volte la settimana per 3 ore di cui 1,30 di terapia, 1,30 di lavoro per la famiglia.
- il periodo complessivo della CTI è di 2 mesi.

Protocollo di valutazione: T0:

1. raccolta di dati anamnestici e clinici circa la compromissione motoria, la presenza di disabilità aggiuntive e/o patologie completanti il quadro di comorbidità complessivo;
2. esame obiettivo e neurologico completo, con valutazione della stereognosi e dello schema corporeo, attraverso il Test della Figura Umana a partire dai 4 anni;
3. valutazione delle abilità motorie globali con la Gross Motor Function Measure (GMFM);
4. scala di sviluppo o valutazione di livello con la scala Griffith24 fino ai 5 anni e successivamente con le scale Wechsler (Wippsi25 fino a 7 anni e Wisch-R26 successivamente);
5. valutazione della funzionalità dell'arto superiore attraverso la scala Quality of Upper Estremità Skills Test (QUEST) e la scala Besta;
6. scala di stress familiare (Parenting Stress Index) e scala delle autonomie redatta dall'Istituto Besta e compilata da parte dei genitori
7. scala di valutazione del comportamento del bambino (Child Behavior Checklist).

Alla fine del trattamento (T1) e dopo 6 mesi (T2) il paziente sarà nuovamente sottoposto alla stessa indagine neuroradiologica che era stata effettuata prima del trattamento e delle valutazioni funzionali sopra descritte.

RISONANZA MAGNETICA (RMN), ANGIO-RISONANZA (MRA) E DIFFUSION TENSOR IMAGING (DTI) NELLO STROKE IN ETÀ EVOLUTIVA: CORRELAZIONI CLINICO-NEURORADIOLOGICHE E VALUTAZIONE DEGLI OUTCOME NEURORIABILITATIVI

DR. ANTONIO TRABACCA

E-MAIL: ANTONIO.TRABACCA@OS.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione Neuromotoria e
Neuropsicologia Funzionale

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Ostuni

Tipo di ricerca

Corrente

Collaborazioni

S.A. di Neuroradiologia – Università Degli Studi di Bari (Prof.ssa Franca Dicuonzo - Prof. Aristide Carella)

DESCRIZIONE

Lo stroke in età evolutiva è una sindrome clinica caratterizzata dalla rapida comparsa di segni focali o disturbi globali delle funzioni cerebrali, di durata superiore a 24 ore o a esito infausto, determinata da occlusione o rottura arteriosa o venosa. La sua incidenza è bassa in età pediatrica soprattutto se confrontata con quella dell'adulto, valutata in Italia dell'ordine di 220 casi/100.000/anno. La maggior parte dei casi sono stati segnalati in età neonatale, nella quale l'incidenza segnalata è di 28 casi/100.000 nati vivi per anno. Un altro picco si ha nella adolescenza, periodo in cui i fattori di rischio si diversificano da quelli delle età precedenti per avvicinarsi a quelli tipici dell'età adulta.

Lo stroke è una causa frequente di disabilità nell'infanzia e può determinare deficit neurologici persistenti. Esiti di infarto cerebrale perinatale possono essere manifesti già nel primo mese di vita (20%), con crisi epilettiche o con episodi di apnea, o successivamente (80%), con deficit motori o ancora con crisi comiziali. La terapia riabilitativa attuale dello stroke infantile si basa su metodi operativi finalizzati all'attivazione della riorganizzazione strutturale che soprattutto in età evolutiva è supportata dal concetto di plasticità cerebrale. Le conoscenze attuali sulle relazioni causali tra fattori di rischio, caratteristiche del danno cerebrale, esiti clinici e outcome sono ancora lacunose e il dato RMN, angio-RMN (MRA) e DIFFUSION TENSOR IMAGING (DTI) rimane

l'indicatore predittivo più specifico di evoluzione clinica.

Lo studio, avviato nel 2009, si propone di valutare una popolazione di soggetti in età evolutiva con storia clinica suggestiva di stroke e con studio neuroradiologico completo (RMN, angio-RM e DTI), allo scopo di correlare i diversi quadri clinico-neurologici e l'outcome neuroriabilitativo. Obiettivo dello studio è quello di individuare eventuali markers predittivi di caratteristiche di funzionamento/disabilità e di outcome nei soggetti con stroke in età evolutiva.

Obiettivi specifici saranno:

- Descrivere le caratteristiche epidemiologiche dello stroke in relazione alla etiologia (ischemico, emorragico-intracerebrale o subaracnoideo, malformazione arterovenosa, angioma cavernoso, aneurisma, trombosi seno-venosa).
- Descrivere le correlazioni emergenti tra:
 - storia familiare
 - fattori di rischio genetici o acquisiti per trombofilia
 - complicazioni gravidiche
 - vasculopatia placentare
 - stato neurologico alla nascita
 - outcome neurologico (paralisi cerebrale, epilessia, impairment cognitivo o del linguaggio)
- Correlare il dato delle neuroimmagini con il quadro clinico
- Correlare il quadro clinico/neurologico con l'outcome neuroriabilitativo.

Caratteristiche del campione:

Nello studio vengono reclutati bambini di età compresa tra 0 e 6 anni con diagnosi di stroke documentato alle neuroimmagini, che accedono all'UO di Neuroriabilitazione 1 dell'IRCCS "E. Medea" di Ostuni.

Ogni soggetto è sottoposto a una serie di valutazioni clinico-funzionali comprendenti:

- Anamnesi clinica personale (fisiologica e patologica) e familiare, con particolare attenzione alla presenza di:
 - a) Fattori di rischio materni
 - b) Fattori di rischio fetali
 - c) Complicazioni della gravidanza: patologie placentari, infezioni, pre-eclampsia, abruptio placentae, aborti in epoca precoce, oligoidramnios
- RMN encefalo e MRA, effettuate nel corso del ricovero o documentate retrospettivamente
- DTI, eseguita previo consenso informato.
- Esame obiettivo generale ed Esame obiettivo neurologico

- Valutazione della funzione motoria
- Valutazione del livello cognitivo
- Valutazione neuropsicologica
- Valutazione psicopedagogia
- Valutazione del linguaggio
- Valutazione psicodiagnostica
- Visite specialistiche (visita ORL, visita oculistica, visita cardiologica con ECG e ecocardiogramma)
- Indagini neurofisiologiche: EEG in veglia, EEG in sonno, PEV flash, ABR a soglia
- Prelievo ematico per routine clinico-chimica
- Screening ematologico trombofilico in madre e bambino
- Screening infettivo/infiammatorio: trombina e serina protease
- Valutazione del profilo immunitario in madre e bambino: autoanticorpi anti-beta2 (IgM e IgG), anticorpi lupus-like anticoagulant, anticorpi anticardiolipina.

Risultati e prodotti conseguiti

La Risonanza Magnetica è la metodica con la maggiore sensibilità nello studio dell'encefalo in età perinatale ed è in grado di valutare lo stato di mielinizzazione e la presenza di lesioni ischemiche grazie alla possibilità di applicare nuove metodiche come diffusione (DWI) e tensore di diffusione (DTI). A partire dai dati del tensore si può inoltre eseguire lo studio trattografico, recente applicazione che consente di valutare anatomicamente l'entità del danno vascolare.

Nel nostro studio sono stati reclutati fino ad oggi 6 bambini di età compresa tra 2 anni e 6 anni, di cui 2 maschi e quattro femmine. 5/6 presentavano quadro posturo-motorio di emiparesi spastica esito di stroke accaduto in epoca perinatale e 1/6 all'età di 2 anni. Un altro bambino presentava marcia instabile, tendenzialmente atassica per quadro di ischemia cerebellare di origine perinatale. 1/6 pazienti presentava epilessia emersa sottoforma di convulsività alla nascita, controllata farmacologicamente. I questionari somministrati alla madre per la valutazione di fattori di rischio fetale, materno e gravidico non hanno fornito informazioni significative.

Gli esami ematici per lo screening delle coagulopatie sono risultati positivi in 2/6 casi in particolare per mutazioni eterozigoti in MTHFR 677TT e G20210A. Dei bambini con stroke perinatale 3/5 presentavano ritardo del linguaggio che risultava povero nel vocabolario e contratto, a tratti inintelligibile. In uno di

questi pazienti tale quadro risultava ulteriormente aggravato dalla presenza di ipoacusia neurosensoriale media bilaterale per cui erano state applicate protesi auricolari.

Il profilo di sviluppo, valutato con l'uso di scale adeguate all'età cronologica dei singoli pazienti, mostrava cadute prevalentemente nelle aree delle performance motorie e di coordinazione occhio-mano e nell'area del linguaggio. I nostri bambini sono stati sottoposti a:

- RMN encefalo secondo il seguente protocollo:
- Sequenza T1
- Sequenza TSE doppio-echo T2 pesata (densità protonica-T2)
- Sequenza FLAIR
- Sequenza GRADIENT ECHO (FFE-FLASH)
- Sequenza 3D T1-weighted MP-RAGE (magnetisation prepared rapid acquisition gradient echo)
- Angio-RM
- DTI

Si è poi proceduto allo studio microarchitetturale delle immagini di diffusione mediante il metodo trattografico.

Attività previste

Lo stroke è una causa frequente di disabilità nell'infanzia e può determinare deficit neurologici persistenti e di entità variabile (epilessia, ritardo mentale, paralisi cerebrale). La terapia riabilitativa attuale dello stroke infantile si basa su metodi operativi finalizzati all'attivazione della riorganizzazione strutturale che soprattutto in età evolutiva è supportata dal concetto di plasticità cerebrale. Vari meccanismi sostengono la plasticità cerebrale: in alcuni casi la funzione dell'area insultata viene vicariata da aree sane e non funzionanti - ciò accade quando lesioni dell'emisfero di sinistra sono rimpiazzate dalle regioni omologhe dell'emisfero controlaterale. In altri casi la ridondanza di alcuni circuiti cerebrali permette alle connessioni neuronali di essere conservate, evitando che vadano altrimenti incontro a scomparsa come risultato di processi di competizione e di selezione. Lo stroke fetale si verifica in un cervello no-competent, nel quale cioè non si verifica una perdita di funzione (in quanto mai o non completamente acquisita), ed è per questo motivo che nel cervello immaturo è possibile dimostrare una capacità di adattamento ad una situazione nuova (post-insulto). Le caratteristiche degli eventuali esiti di stroke sono strettamente legate al timing dell'insulto. In particolare, se l'insulto accade dopo la 30W di gestazione, quando le strutture sono già pienamente formate, la riorganizzazione cerebrale risulta più difficile e la neu-

roplasticità limitata. Tuttavia, se l'insulto accade durante la vita embrionale, ne possono gravi malformazioni, talora incompatibili con la vita.

Esistono meccanismi di riarrangiamento sinaptico e di plasticità assonale alla base della plasticità cerebrale che possono essere innescati sia da meccanismi intrinseci che da meccanismi estrinseci (questi ultimi derivanti dalle esperienze di vita).

Le immagini convenzionali (RMN e Angio-RM) possono fornire informazioni relative ad un insulto ischemico e permettere di effettuare correlazioni di base tra etiologia, fattori di rischio, caratteristiche del danno cerebrale, esiti clinici ed outcome. Esse rimangono attualmente l'indicatore predittivo più specifico di evoluzione clinica.

Le tecniche di immagine non convenzionali, come le tecniche di diffusione (DTI), si caratterizzano per una maggiore possibilità di evidenziazione del tessuto ischemico e permettono un più accurato timing dell'insulto. Esse si basano sulla misurazione dei movimenti casuali delle particelle di acqua all'interno di un tessuto (diffusività), che a sua volta può essere calcolata attraverso il Coefficiente di Diffusione Apparente (ADC). In particolare, il tensore di diffusione (DTI) può essere usato per mappare e caratterizzare la diffusione tridimensionale dell'acqua che è considerata indicatore della funzione della localizzazione territoriale.

Nella fase acuta dell'ischemia cerebrale la traccia della diffusività media decresce significativamente in corrispondenza della lesione, per poi ricominciare a normalizzarsi dopo alcuni giorni dall'evento ischemico. Invece, le lesioni ischemiche croniche (> 2 settimane) tipicamente dimostrano un'aumentata diffusività media come risultato di una encefalomalacia.

Le misure DTI possono rappresentare indicatori prognostici di progressione della malattia e di risposta alla terapia riabilitativa post-stroke.

In particolare, prime evidenze sperimentali mostrano che la diffusività media della sostanza bianca normale correla con le performances cognitive (QI e funzioni esecutive), mentre la frazione di anisotropia del tratto corticospinale è stato dimostrato correlare con il recupero funzionale motorio. Entrambi questi due indici possono quindi essere considerati buoni predittori di outcome clinico.

Il metodo trattografico rappresenta un'ulteriore studio che utilizza un algoritmo capace di generare, sulle immagini derivate dal tensore di diffusione, stime plausibili delle traiettorie relative alle fibre nervose all'interno della sostanza bianca. La trattografia quindi può essere utilizzata per effettuare vere e proprie ricostruzioni delle proiezioni dei maggiori tratti anatomici e delle vie commisurali. Analogamente, in termini di neuropatologia, la trattografia permette un mappaggio dell'anatomia funzionale specifica e, per queste sue peculiari possibilità può essere usata per seguire l'andamento della plasticità

cerebrale.

Le tecniche di angiografia e di venografia sono ulteriori complementi per la valutazione clinica e, quando combinate con la studi di perfusione, possono dare informazioni utili per circa lo sviluppo dei vasi dopo l'insulto e fornire informazioni sulla suscettibilità intrinseca di un individuo all'insulto ischemico stesso.

La plasticità è interessata non solo nelle funzioni motorie, ma anche nelle abilità cognitive.

Obiettivo della continuazione dello studio è quello di ampliare la casistica già in nostro possesso ed effettuare negli stessi pazienti arruolati, là dove possibile, una seconda valutazione clinica e strumentale a 6 mesi dal TO, utilizzando i metodi e gli strumenti indicati nel protocollo di studio. Obiettivo finale è quindi quello di effettuare prime correlazioni tra quadro clinico e dati derivanti dalle neuroimmagini (TO) e di valutare se, nell'intervallo temporale di 6 mesi durante il quale i nostri bambini proseguono i trattamenti riabilitativi del caso, possano essere registrate variazioni alle neuroimmagini, nel senso di una riorganizzazione cerebrale, sulla base del concetto di neuroplasticità.

IMPIEGO CLINICO DI UN SISTEMA BRAIN COMPUTER INTERFACE (BCI) PER LA VALUTAZIONE TESTOLOGICA DI SOGGETTI AFFETTI DA GRAVI PATOLOGIE NEUROMOTORIE

DR.SSA ANNA CARLA TURCONI

E-MAIL: ANNACARLA.TURCONI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione Neuromotoria e
Neuropsicologia Funzionale

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Bosisio Parin

Tipo di ricerca

Corrente

Collaborazioni

Dipartimento INDACO, Politecnico di Milano

DESCRIZIONE

La BCI (Brain Computer Interface) è un sistema che non necessita delle tradizionali vie neuromuscolari per la trasmissione dei messaggi dell'utente con l'ambiente circostante (atti motori), ma permette la comunicazione direttamente attraverso il segnale celebrale. Questa peculiarità risulta importante per un utente completamente paralizzato, in quanto possibile soluzione con cui questi potrebbe comunicare con gli altri. Esistono differenti tipologie di BCI (dipendente ed indipendente a seconda se necessitano o meno delle vie muscolari per la generazione del messaggio) a seconda delle quali si ha una diversa velocità e accuratezza. Una delle BCI più performanti è la BCI basata sui potenziali evocati visivi steady state (SSVEP); questi potenziali sono una serie di segnali continui e periodici in risposta a stimoli visivi che si presentano in un range di frequenza dai 3,5 ai 75Hz. Gli SSVEP sono onde quasi sinusoidali che si trasmettono alla stessa frequenza dello stimolo e sono particolarmente evidenti nella regione occipito-parietale dello scalpo. La Brain Computer Interface basata su paradigma SSVEP è considerata una BCI dipendente in quanto necessita di un livello basilare di controllo dei movimenti oculari per la generazione del segnale necessario al sistema. La BCI basata su SSVEP può essere utilizzata sul 70/80% della popolazione in quanto non tutte le persone sono soggette a "trascinamento" (generano cioè il segnale SSVEP se sottoposte a stimolazione visiva intermittente).

In letteratura si possono trovare differenti applicazioni per cui la BCI può essere utilizzata come mezzo per soppiantare le normali vie di comunicazioni neuromuscolari per la trasmissione dei messaggi, applicazioni soprattutto

in ambito domiciliare (comando della sedia a rotella, navigazione web, domotica). In ambito clinico/ospedaliero la BCI trova invece un ristretto campo applicativo, sia a causa della sua lentezza intrinseca, sia per la difficoltà che l'installazione di un tale sistema comporta.

L'Obiettivo di questa attività è lo sviluppo di un protocollo BCI per la realizzazione e l'utilizzo di un sistema di brain computer interface per applicazioni in ambito clinico. In questo attività sperimentale verrà proposto un nuovo metodo per somministrare il test delle matrici progressive (o test di Raven) a soggetti che, a causa di patologie o disfunzioni, non hanno la possibilità di eseguire questo test.

Attività previste

Il protocollo sperimentale prevede il reclutamento di un primo gruppo di 15 pazienti affetti da patologie disabilitanti con grave deficit motorio quali PCI e paraparesi spastiche familiari, e di un secondo gruppo di 15 soggetti sani di controllo.

I soggetti inclusi nello studio devono soddisfare i seguenti criteri:

INCLUSIONE CLINICA:

Età cronologica: 20-45 anni

No ipovedenti

No disturbi oculomotori

INCLUSIONE BCI:

Il soggetto trascina

Il soggetto è in grado di utilizzare la BCI per il Test

Il controllo verrà effettuato con un doppio matching: per età cronologica e per età mentale. Verranno dapprima eseguiti i test su soggetti patologici; in base alla popolazione raccolta verranno poi selezionati i soggetti per la popolazione di confronto.

Una volta selezionati i soggetti in base ai criteri di inclusione clinica si darà inizio alla prova sperimentale che prevede due fasi successive:

PRIMA FASE: durata media totale stimata di circa 45-50 minuti.

Step 0: Preparazione del soggetto: durata media: 10-15 minuti.

Il soggetto viene collegato al sistema EEG (GMobilab – Gtek (AU) con otto elettrodi in posizione occipitale (O1, Oz, O2, P3, Pz, P4, T5, T6 secondo il sistema internazionale 10-20), elettrodo di massa in G e riferimento auricolare all'orecchio destro. Le impedenze degli elettrodi devono essere inferiori a 10KΩ;

Step 1: Screening: durata media 10 minuti.

Il soggetto viene posto a un metro circa dallo schermo. Un segnale sonoro

ed una freccia a video indicano al soggetto quale stimolatore guardare. Il soggetto fissa lo stimolatore per circa 8 secondi. Questa procedura viene ripetuta 12 volte in modo da identificare se il soggetto “trascina”, è in grado cioè di generare il pattern SSVEP (circa il 70% della popolazione) e su quali frequenze.

Una successiva analisi offline determina se il soggetto trascina e quali frequenze sono le migliori.

Dopo questa fase potrebbe verificarsi una prima esclusione dovuta alla mancanza di trascinamento.

Step 2: Calibrazione: durata media 10 minuti.

Al soggetto, posto davanti allo schermo, viene indicato di concentrarsi sullo stimolatore verso cui punta la freccia a video, in modo che la barra del bio-feedback, posta a fianco dello stimolatore, si allarghi il più possibile. Segue una elaborazione offline per l'addestramento del classificatore per l'estrazione del comando dal segnale EEG.

Step 3: Testing: durata media 2 minuti.

In questa fase al soggetto viene proposto un breve test per verificare il corretto funzionamento del sistema. Il soggetto deve riuscire, fissando lo stimolatore indicato dalla freccia, a dare 8 comandi commettendo il minor numero di errori possibile.

Step 4: Astrobrain fight: durata media 2 minuti.

In questa fase il soggetto deve “giocare” con la BCI. Il gioco consiste in una battaglia tra astronavi, il soggetto deve spostare la propria astronave utilizzando le quattro direzioni (indicate dai quattro stimolatori) in modo da collidere per cinque volte con l'astronave nemica, posta in posizioni pseudo casuali sullo schermo. Obiettivo di questa fase è quello di addestrare il soggetto all'utilizzo del sistema ed, in particolar modo, a guardare e concentrarsi sullo stimolatore luminoso.

Step 5: SSVEP toon training: durata media 2-3 minuti.

Questa fase è pensata per abituare il soggetto ad utilizzare il sistema di scelta che verrà utilizzato durante il test di Raven. In questa fase il soggetto seleziona attraverso sei immagini un video che verrà visualizzato nella parte superiore dello schermo (Fig.1). La selezione è libera.

Step 6: SSVEP matching: durata media 2-3 minuti.

Questa fase è l'ultimo test per la verifica dei criteri di inclusione BCI. Al soggetto vengono presentate tre tavole con la stessa configurazione che verrà successivamente utilizzata per il test di Raven. Il soggetto deve selezionare la risposta in base alla figura riportata nella parte superiore dello schermo.

Questo test può essere ripetuto anche più volte per adattare il soggetto all'utilizzo del sistema. Può essere utile anche successivamente per dimostrare

quanto la BCI influisca sul test.

SECONDA FASE: durata media 40-45 minuti.

I soggetti che hanno soddisfatto i criteri di inclusione BCI, testati con la prima fase, vengono sottoposti ad una seconda fase che può essere effettuata dopo una breve pausa o in un giornata di acquisizione successiva.

Per la seconda fase viene riproposta la calibrazione del sistema, il test di matching a cui segue il test di Raven 1938 (Advanced Progressive Matrices) o 1947 (Coloured Progressive Matrices).

Il TEST DI RAVEN è composto da 12 tavole per ogni sequenza. Ogni tavola viene visualizzata a tutto schermo con le 6/8 risposte. Una pausa iniziale di 5 secondi in cui gli stimolatori sono spenti permette al soggetto di ricercare la soluzione. Dopo 5 secondi vengono accesi gli stimolatori. Il soggetto, guardando uno degli stimolatori, muove avanti e indietro la selezione della risposta. Quando viene selezionata la risposta desiderata il soggetto fissa lo sguardo sulla propria risposta, automaticamente questa verrà contornata di nero dopo 3 secondi. A questo punto verrà acceso lo stimolatore superiore. Se la risposta che si vuole dare corrisponde alla risposta con contorno nero, il soggetto deve concentrare la propria attenzione sullo stimolatore superiore per confermare la risposta. Se invece il soggetto si accorge per tempo dell'errata selezione, guardando lo stimolatore a destra o sinistra, muove la propria selezione, il contorno nero scompare e viene spento lo stimolatore superiore. Il file salvato è importabile in excell e contenente:

- Nome del test
- Cinque colonne con:
- Risposte corrette
- Risposte date dal soggetto
- Tempo per ogni risposta (contiene la pausa iniziale per ogni risposta).
- Numero di mosse minime
- Numero di mosse eseguite
- Totale risposte corrette
- Tempo medio risposta
- Tempo totale del test
- Tempo test dovuto alle varie pause per pensare di 5 secondi + vari tempi di caricamento immagini

Protocollo per prove sperimentali su soggetti sani di controllo

I soggetti di controllo, oltre ad effettuare il test con la BCI con lo stesso protocollo dei soggetti patologici e con gli stessi criteri di inclusione BCI, dovranno effettuare un test di Cattell per il calcolo del QI.

STUDIO CON TECNICHE DI NEUROIMAGING E NEUROFUNZIONALI DEL RECUPERO DELLE FUNZIONI COGNITIVE NEL PAZIENTE CON CEREBROLESIONE ACQUISITA IN ETÀ PEDIATRICA: RUOLO DELLA RIABILITAZIONE NEUROPSICOLOGICA

DR.SSA SANDRA STRAZZER

E-MAIL: SANDRA.STRAZZER@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione Neuromotoria e
Neuropsicologia Funzionale

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Bosisio Parini

Tipo di ricerca

Corrente

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Centro Studi di Neuroimaging dell'età Evolutiva CeSNE

DESCRIZIONE

Le cerebro-lesioni acquisite e in particolare il trauma cranico rappresenta la più comune causa di morte tra i bambini e gli adolescenti che vivono nelle società occidentali. (Goldstein and Levin, 1987). Com'è facilmente comprensibile, queste patologie sono legate a costi sociali e sanitari particolarmente elevati, visto che si instaurano problemi che tendono a cronicizzare. Le sequele neurologiche possono portare a deficit neuromotori, cognitivi, comportamentali e psicologici. I deficit cognitive comprendono problemi linguistici, visuo-percettivi e prassico-costruttivi, mnestici, attentivi, delle funzioni esecutive e nella velocità di elaborazione degli stimoli. Tali deficit rappresentano un problema assai rilevante per tali pazienti, dal momento che interferiscono seriamente con i processi riabilitativi e, soprattutto, con il ritorno a scuola ed all'attività lavorativa (Capruso and Levin, 1992). Diversi studi hanno dimostrato che proprio i deficit neuropsicologici risultano essere i più importanti fattori nel determinare gli esiti a lungo termine per questi pazienti (Brooks et al., 1987; Mc Kinlay et al., 1981).

A causa dell'imaturità del SNC, le sequele neuropsicologiche di un danno cerebrale occorso in età evolutiva possono non solo essere differenti, ma anche più generalizzate rispetto a quelle conseguenti al medesimo danno su un cervello ormai pienamente sviluppato. Inoltre, più precoce è l'età al momento della lesione, maggiore è l'impatto su funzioni ancora non pienamente

sviluppate come l'attenzione (Dennis, 1989). Per tale motivo le implicazioni di tali deficit in età evolutiva possono essere duplici: oltre al danno specifico provocato dalla lesione, potrebbe verificarsi un impatto massivo sullo sviluppo cerebrale, con conseguente incapacità ad acquisire le abilità necessarie per gli apprendimenti formali. Tali difficoltà possono interferire con il normale processo di sviluppo del bambino, con la sua interazione con l'ambiente e con le acquisizioni scolastiche e sociali. D'altro canto, l'impossibilità di frequentare un normale corso di studi, e di conseguenza l'isolamento dai pari, influisce negativamente sullo sviluppo psicologico e sociale dei bambini, aumentando il rischio di sviluppare disturbi psicologici e psichiatrici.

In questi ultimi anni nella nostra Unità Operativa stiamo studiando i processi di recupero delle singole funzioni cognitive dei pazienti con cerebrolesione acquisita.

In questo progetto vogliamo approfondire le modifiche funzionali e strutturali del Sistema Nervoso Centrale durante la fase di recupero riabilitativo in fase subacuta fino alla fase degli esiti tramite esami di Risonanza Magnetica (RM) e neurofunzionali (fRM e Functional Near InfraRed technology).

Tavano A, Galbiati S, Recla M, Formica F, Giordano F, Genitori L, Strazzer S. Language and cognition in a bilingual child after traumatic brain injury in infancy: long-term plasticity and vulnerability. *Brain Inj.* 2009 Feb;23(2):167-71.

Galbiati S, Recla M, Pastore V, Liscio M, Bardoni A, Castelli E, Strazzer S. Attention remediation following traumatic brain injury in childhood and adolescence. *Neuropsychology.* 2009 Jan;23(1):40-9.

Liscio M, Adduci A, Galbiati S, Poggi G, Sacchi D, Strazzer S, Castelli E, Flannery J. Cognitive-behavioural stimulation protocol for severely brain-damaged patients in the post-acute stage in developmental age. *Disabil Rehabil.* 2008;30(4):275-85.

Attività previste

Verranno inclusi i pazienti ricoverati presso l'Istituto IRCCS E. Medea con esiti di grave cerebrolesione acquisita (GCS<8), con un'età compresa tra 6 e 18 anni e che al momento del termine della fase acuta/stabilizzazione clinica presentano un deficit cognitivo, in particolare dell'attenzione sostenuta e di alcune funzioni esecutive, quali la capacità di inibizione di una risposta fortemente attivata, includendo quelli che presentano un punteggio patologico all'indice di prestazione globale al Continuous Performance Test (CPT) (OVERALL INDEX>11).

Verranno esclusi dallo studio soggetti con $QI < 50$ o compromissione comportamentale, infatti tali condizioni pregiudicano la performance e la collaborazione necessaria per eseguire la ricerca. Inoltre verranno esclusi i pazienti con cerebropatia e disturbi psichiatrici o comportamentali precedenti l'evento acuto.

Verranno impostati programmi riabilitativi complessivi e ogni paziente inserito nello studio eseguirà un training neuropsicologico specifico di attenzione sostenuta con attività a tavolino (matrici attenzionali, giochi di associazione e materiale educativo) ed al computer (programma REHACOM - Schuhfried, 1996- ed ERICKSON - Di Nuovo, 1992-). Il training durerà 2-3 mesi, con 4 - 5 sedute individuali settimanali di quarantacinque minuti l'una.

Tutti i pazienti riceveranno in fase di ingresso nello studio e al termine del trattamento riabilitativo una valutazione clinico-funzionale multidisciplinare appropriata per l'età comprendente: esame neurologico, valutazione fisiatrica, oculistica, otorinolaringoiatria, audiometria, valutazione cognitiva e psicologica. Di ogni paziente saranno raccolti quindi i seguenti dati demografici e clinici: sesso, scolarità, età al momento del trauma, età alla valutazione, intervallo di tempo tra trauma e inizio della riabilitazione, giorni di non responsabilità, prevalente sede della lesione (suddivise in tre categorie: frontale, posteriore e DAI), esecuzione o non esecuzione dell'intervento neurochirurgico, presenza/assenza di afasia, presenza o assenza di invalidanti deficit sensoriali (visivo, uditivo) o motori (emiplegia, tertraplegia, atassia).

I pazienti eseguiranno una valutazione funzionale NIRS e di RM in fase di ingresso nello studio e al termine del trattamento riabilitativo. Il gruppo di controllo per gli esami funzionali è costituito da un gruppo di soggetti senza precedenti neurologici, di paragonabile età.

Misure della valutazione cognitiva e psicologica

La valutazione cognitiva comprenderà un test di livello, Wechsler Intelligence Scale (WISC-R, WAIS-R) (Wechsler, 1974), che fornisce tre quozienti intellettivi rispettivamente quello totale (QIT), quello verbale (QIV), e quello di performance (QIP).

La valutazione della capacità attentiva ed alcune funzioni esecutive verrà approfondita attraverso il Continuous Performance Test II (CPT II- Conners, 1992). Il CPT II è un test di attenzione sostenuta standardizzato e computerizzato, utilizzato sia a scopo di ricerca che in ambito clinico. Questo strumento è stato scelto perché standardizzato su un ampio campione normativo, ha dimostrato una buona capacità di discriminazione del deficit di attenzione sostenuta e può essere somministrato anche a pazienti con deficit motori.

- Wisconsin Card Sorting Test (WCST) (R.K. Heaton, 2000)

Il test viene utilizzato per esaminare la flessibilità delle strategie nel problem solving ed inoltre la sensibilità del soggetto al feedback proveniente dal risultato della propria esecuzione. Inoltre il test sembra particolarmente appropriato per lo studio della perseverazione; quindi viene richiesta la capacità di sviluppare e mantenere un'appropriata strategia di problem solving al cambiare delle condizioni ambientali. Come tale il WCST non fornisce soltanto i punteggi oggettivi relativi al successo globale ma anche le fonti specifiche di difficoltà nel compito.

- Child Behavior Checklist/4-18 (CBCL, Achenbach, 1991)

È uno degli strumenti maggiormente utilizzati nella ricerca e nella pratica clinica per valutare le competenze e gli aspetti problematici, sia di tipo comportamentale, che emotivo di bambini/ragazzi. Si basa sulle descrizioni fornite dai caregivers a cui è richiesto di valutare il comportamento del proprio figlio. Esistono due versioni della CBCL, distinte in base all'età di applicazione: 2-3 anni e 4-18 anni. I dati raccolti possono contribuire alla formulazione di un quadro diagnostico, a seconda di quanti i punteggi alle diverse scale si discostino dai limiti di norma. Il profilo della CBCL (4-18 anni) permette di evidenziare le seguenti otto sindromi: ritiro, lamentele somatiche, ansia/depressione, problemi sociali, di pensiero, di attenzione, comportamento delinquenziale, aggressivo.

Esami strumentali

Near Infrared Reflectance Spectroscopy

La Tecnica NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) è un metodo di analisi secondario che sfrutta alcune proprietà fisiche della materia ed in particolare l'interazione di questa con le radiazioni del vicino infrarosso. Questa tecnica si avvale della specifica capacità di ogni composto chimico di assorbire, trasmettere o riflettere la radiazione luminosa. La combinazione delle proprietà assorbenti, combinate con quelle di dispersione dell'energia luminosa, determina la diffusa riflettanza della luce, che contiene informazioni sulla composizione chimica del campione. La fNIRS (Functional Near Infrared Spectroscopy), più in particolare, consente di misurare a livello regionale e in modo non invasivo le variazioni nella concentrazione di emoglobina deossigenata (deoxy-Hb) e di emoglobina ossigenata (oxy-Hb), che caratterizzano l'attività cerebrale del soggetto (Strangman et al, 2002). Nel corso degli ultimi anni, la tecnologia NIRS è stata ulteriormente raffinata, e in letteratura sono riportate interessanti applicazioni nell'ambito delle neuroscienze (Izzetoglu et al., 2002, 2003).

Lo studio prevede la messa a punto di paradigmi adatti alla nostra casistica e ai problemi neuropsicologici che vogliamo studiare, in particolare attenzione

e funzioni esecutive.

RM encefalo studio morfologico ad alta risoluzione e RM funzionale

Per valutare la rima corticale con la più alta risoluzione spaziale possibile, verrà utilizzato un protocollo RM dedicato ad alta risoluzione spaziale.

I pazienti verranno sottoposti a RM dell'encefalo con scanner a 3 Tesla e nuova bobina della testa a 32 canali di ricezione, sviluppata recentemente da Philips Medical Imaging.

Verranno utilizzate sequenze 3D e 2D pesate in T2 con risoluzione spaziale planare compresa tra 220 e 250 micron spessore di sezione 1mm.

Verranno inoltre acquisite immagini 3D fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) con voxel pari a 1x1x1mm e 3D pesate in T1 (MPRAGE) con voxel pari a 1x1x1mm.

Per ottenere misure quantitative del parametro T2 del parenchima cerebrale verranno calcolate mappe assiali T2 utilizzando una sequenza spin echo pesata in T2 a 8 echi (20-240 ms).

Verranno inoltre eseguite acquisizioni DTI tradizionali con gradienti applicati in 35 direzioni e saranno testate acquisizioni "high angular resolution diffusion imaging" (HARDI) a maggior numero di direzioni e con valore di b maggiore di 1000.

La geometria (campo di vista) e lo spessore di tutti i volumi di acquisizione saranno mantenuti uguali in tutte le sequenze in modo tale da consentire una migliore coregistrazione sia tra loro che con i dati di fMRI e trattografia (DTI- fiber tracking). L'orientamento delle acquisizioni seguirà il piano della commessura antero-posteriore (linea AC-PC).

I dati morfologici ottenuti saranno coregistrati con quelli ottenuti nell'analisi funzionale (fMRI) e di fiber tracking.

Per la RMN funzionale verrà utilizzato un magnete 3.0 Tesla (Philips), verranno acquisite le seguenti sequenze: sequenza fast field echo pesata in T1 3D ad alta risoluzione; fMRI: sequenza single-shot echo-planar imaging (EPI) pesata in T2.

Lo studio prevede la messa a punto di paradigmi adatti alla nostra casistica e ai problemi neuropsicologici che vogliamo studiare, in particolare attenzione e funzioni esecutive.

L'articolazione del programma prevede

Dal 1 al 4 mese:

1. Messa a punto dei protocolli
2. Creazione del paradigma di studio per la fRM e NIRS
3. Preparazione data base

Dal 3 mese in poi:

4. Reclutamento dei pazienti
5. Studio clinico della casistica (ingresso studio/termine riabilitazione cognitiva in fase subacuta)
6. RM morfologica
7. Valutazione fNIRS e fRM (ingresso studio/termine riabilitazione cognitiva in fase subacuta)

8. Raccolta dati

Ultimi 2 mesi:

9. Elaborazione dati e preparazione lavoro scientifico

PROBLEM SOLVING: ADATTAMENTO E APPLICAZIONE DEL “RUSK INSTITUTE PROTOCOL FOR REHABILITATION OF PSYCHOSOCIAL COMPETENCIES” ALLA REALTÀ ITALIANA: CONFRONTO TRA PAZIENTI IN ETÀ ADOLESCENZIALE E ADULTA

DR.SSA SANDRA STRAZZER

E-MAIL: SANDRA.STRAZZER@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione Neuromotoria e
Neuropsicologia Funzionale

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Bosisio Parini

Tipo di ricerca

Corrente

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: IRCCS “E. Medea” Pieve di Soligo

DESCRIZIONE

Le cerebro-lesioni acquisite e in particolare il trauma cranico determinano sequele neurologiche che possono portare a deficit motori, cognitivi, comportamentali e psicologici. I deficit cognitivi comprendono problemi linguistici, visuo-percettivi e prassico-costruttivi, mnestici, attentivi, delle funzioni esecutive e nella velocità di elaborazione degli stimoli. Tali deficit rappresentano un problema assai rilevante per tali pazienti, dal momento che interferiscono seriamente con i processi riabilitativi e, soprattutto, con il ritorno a scuola ed all'attività lavorativa (Capruso and Levin, 1992). Com'è facilmente comprensibile, queste patologie sono legati a costi sociali e sanitari particolarmente elevati, visto che si instaurano problemi che tendono a cronicizzare. Diversi studi hanno dimostrato che proprio i deficit neuropsicologici risultano essere i più importanti fattori nel determinare gli esiti a lungo termine per questi pazienti (Brooks et al., 1987; Mc Kinlay et al., 1981).

In Italia sta incrementando negli ultimi anni l'integrazione tra l'approccio riabilitativo di tipo neuropsicologico e quello cognitivo-comportamentale. L'esperienza delle nostre Unità Neuro-riabilitative delle Cerebrolesioni Acquisite sulla riabilitazione neuropsicologica verte maggiormente in programmi specifici per la memoria, l'attenzione, l'esplorazione visiva, i disordini delle funzioni esecutive, in bambini e adulti. L'approccio è globale e multiprofessionale.

The Rusk Institute of Rehabilitation Medicine (New York University) ha recentemente sviluppato un programma riabilitativo per i disordini che compro-

mettono il “problem solving” dei pazienti con lesioni centrali. Il trattamento è stato valutato in piccoli gruppi, ma è anche eseguito con sedute individuali. Il metodo porta ad un recupero del deficit cognitivo specifico, ma anche delle altre funzioni cognitive che vengono valutate con tests psicometrici, valutazioni neuropsicologiche e psicologiche-comportamentali.

L'obiettivo del progetto è valutare l'applicabilità nel contesto Italiano del modello statunitense del Rusk Institute NYU in una versione modificata. Inoltre sarà quello di valutarne l'efficacia rispetto al trattamento tradizionale eseguito nei nostri centri.

Non si prevedono rischi clinici. Se il metodo non si dimostrasse efficace ci potrebbe essere un drop-out dei pazienti. I benefici per i pazienti dovrebbero riguardare la sfera psicosociale con miglioramento delle capacità relazionali compromesse dal trauma sia nel contesto esterno come in quello familiare. Dovrebbe migliorare anche la consapevolezza di sé, delle proprie reazioni emozionali, delle competenze relazionali.

References

Rath, J. F., Simon, D., Langenbahn, D. M., Sherr, R. L., Diller, L. (2003). Group treatment of problem-solving deficits in outpatients with traumatic brain injury: a randomised outcome study. *Neuropsychological Rehabilitation*, 13(4), 461-488.

Sherr, R. L., Langenbahn, D. M., Simon, D., Rath, J. F., & Diller, L. (1996a). *Problem Solving Roleplay Test*. New York: New York University School of Medicine, Rusk Institute of Rehabilitation Medicine.

Attività previste

Il progetto prevede:

- A) Traduzione e adattamento alla realtà italiana dell'assessment cognitivo-comportamentale, prevedendo 2 versioni: una per età compresa tra i 14-20 anni e una per adulti
- B) Arruolamento e valutazione clinica dei pazienti con scale adatte per età e competenza
- C) Trattamento riabilitativo di tipo sperimentale o tradizionale
- D) Verifica dell'efficacia del trattamento rispetto a pazienti con cerebrolesioni acquisite paragonabili per età, livello neuropsicologico-comportamentale, tramite un assesment:
 - a. Neuropsicologico
 - b. Comportamentale
 - c. Funzionale

E) Valutazione dei dati, nel confronto intragruppo fra i due tipi di trattamento e tra gruppo di adolescenti e pazienti di età adulta

Metodo

Criteria d'inclusione

- danno cerebrale acquisito
- LCF 7 and LCF 8
- Problem Solving Disorders (verificati con BADS, WCST, raven 38) /or functional assessment and/or CRF)
- Almeno 3 mesi successivi al trauma

Criteria di esclusione

- Disordini comportamentali gravi
- Deficit motori, sensoriali e afasici gravi
- Trauma successivo ai 5 anni
- Altri trattamenti cognitivi contemporanei
- Trattameto di psicoterapia

Gruppo sperimentale e di controllo

1 gruppo sperimentale di 20 pazienti

1 gruppo controllo di 20 pazienti

I due gruppi devono essere bilanciati almeno 4 di queste variabili:

- età,
- livello educazione,
- tempo d'insorgenza del danno cerebrale,
- assessment neuropsicologico,
- assessment funzionale
- cognitive behavioral assessment

La randomizzazione nei 2 gruppi è fatta da un "blind researcher"

La valutazione dei pazienti è fatta da persone che non conoscono il progetto o che non sanno in che gruppo il paziente è posto.

Assessment

Neuropsychological

Batteria funzioni esecutiva

WCST (Heaton et al., 2000)

VERBAL FLUENCY (PHONEMIC CUE)

TEA – go-no-go (2 on 5)

TEA – divided attention

Memory of prose (Capitani version)

Raven 38 (Spinnler & Tognoni)

Cognitive

Problem Solving Questionnaire (PSQ: Sherr et al., 1997)

Clinician Rating Form – Self Regulation and Problem Solving: patient and professional rating NB: only for outpatients

Adjunct Skills Questionnaire (ASQ: Hanig et al., 1993) – adapted for individual therapy

Problem Solving Role-playing Test - Revised 2008 (PSRT: Sherr et al., 1996)

Functional

FIM e FAM

European Behavioral Questionnaire (EBIQ: Teasdale et al., italian adaptation of Tressoldi et al. 2004)

Setting

Trattamenti individuali: 2 per settimana, 45 minuti ciascuna

Sessioni di lavoro

Gruppo Sperimentale

12 sessioni:

- Self regulation
 - 1-2 intro and overview
 - 2-3 problematic context and strategies
 - 3-4 pitfalls
 - 5-6 integration and generalization of strategies use
- Problem solving
 - 7-8 knowing you have a problem
 - 8-9 problem definition and goal
 - 9-10 options, evaluation, follow-up
 - 10-12 integration and generalization

Gruppo di Controllo

12 sessioni: trattamento tradizionale neuropsicologico e/o psicologico mirato ai deficit di: attenzione, memoria, funzioni esecutive e/o al supporto psicologico

- Attention

- 1 intro and overview
- 2-3 selective attention and shifting
- 4-6 divided attention
- Memory
 - 7-8 prospective memory and strategies use
 - 8-9 learning in LT memory and cognitive strategies
- Executive Functions
 - 9-10 categorization, classification, analogies, differences, clustering
 - 10-11 reasoning
 - 11-12 integration and generalization

La misura dell'outcome

Al termine del trattamento e nel follow up, l'assessment deve essere fatto in una giornata valutativa.

- Alla fine del trattamento (massimo a distanza di una settimana) si ripetono le stesse valutazioni dell'ingresso
- Follow-up
 - A 6 mesi: assessment cognitivo e funzionale
 - A 12 mesi: assessment cognitivo, neuropsicologico e funzionale

IL SODDISFACIMENTO DEL BISOGNO DI MOBILIZZAZIONE NELL'ASSISTENZA INFERMIERISTICA AL NEONATO/BAMBINO FRATTURATO AFFETTO DA OSTEOGENESI IMPERFETTA

DR.SSA ORIETTA MILANI

E-MAIL: ORIETTA.MILANI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione Neuromotoria e Neuropsicologia Funzionale

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Bosio Parini

Tipo di ricerca

Corrente

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Poli dell'IRCCS "E. Medea" e Centri di Riabilitazione "La Nostra Famiglia" Associazione Italiana Osteogenesi Imperfetta (AS.IT.O.I.)

DESCRIZIONE

Il bisogno specifico di assistenza infermieristica è la necessità, l'esigenza da parte dell'uomo di ricevere assistenza infermieristica qualora si verificano particolari condizioni fisiche o psichiche che lo richiedano.

Nel neonato/bambino affetto da Osteogenesi Imperfetta, il bisogno di mobilitazione rappresenta la necessità principe dell'assistito e l'obiettivo prioritario per l'infermiere che con le loro prestazioni garantiscono il soddisfacimento del bisogno.

L'esigenza di rispondere al bisogno di mobilitazione di neonati/bambini affetti da Osteogenesi Imperfetta che hanno subito delle fratture, rappresenta per l'infermiere un momento di notevole stress, per la paura di arrecare ulteriore danno, provocando nuove fratture durante l'effettuazione delle prestazioni assistenziali necessarie.

Il progetto intende elaborare delle linee guida sul comportamento da tenere in tali situazioni, individuando le tecniche di mobilitazione da utilizzare con il bambino affetto da Osteogenesi Imperfetta e fratturato, in modo da permettere all'infermiere un approccio competente e sicuro in ogni prestazione assistenziale.

La modalità di approccio al problema prevede:

- la valutazione della relazione tra lo stress del personale infermieristico che gestisce i bambini affetti da Osteogenesi Imperfetta e la carenza di indicazioni specifiche su come soddisfare il bisogno di mobilitazione

dopo una frattura accidentale

- l'individuazione delle sequenze di movimenti che permettono all'infermiere di mobilitare il neonato/bambino con il minor numero possibile di passaggi per i trasferimenti
- l'individuare dei presidi da utilizzare per eseguire i trasferimenti all'interno e all'esterno della struttura in sicurezza
- l'individuare le modalità di mobilitazione dei diversi segmenti corporei per la cura del bambino (vestirlo, cambiare il pannolino, posizionarlo per l'alimentazione)
- l'individuare le modalità assistenziali idonee ad evitare ulteriore danno nella mobilitazione del bambino con Osteogenesi Imperfetta già fratturato
- organizzare incontri di educazione sanitaria per i care giver dei bambini affetti da osteogenesi imperfetta.

L'indagine conoscitiva per la valutazione dello stress tra il personale infermieristico potrebbe essere condotta nei punti di riferimento italiani per l'OI (C.O.C. Valeggio sul Mincio Verona, Clinica pediatrica Borgo Roma Verona, Centro per la diagnosi, il trattamento e il follow-up dell'osteogenesi imperfetta: clinica pediatrica Il policlinico Umberto I, Roma, IRCCS E. Medea Bosisio Parini Lecco e Centro studi della Scoliosi Secondigliano Napoli)

Attività previste

Ricerca bibliografica consultando le principali banche dati del settore, con attenzione particolare alla ricerca di revisioni sistematiche che trattino dell'assistenza infermieristica al neonato/bambino con osteogenesi imperfetta.

Nello specifico poi il programma di lavoro prevede:

- 1° costruzione di un questionario strutturato che rilevi le variabili che fanno emergere un rapporto di covarianza tra lo stress vissuto dal personale infermieristico nell'accudimento del bambino con osteogenesi imperfetta fratturato, e il dover soddisfare il bisogno di mobilitazione senza indicazioni specifiche
- 2° identificazione di un campione statisticamente significativo per lo studio
- 3° taratura del questionario
- 4° raccolta dati
- 5° analisi dei risultati
- 6° studio delle sequenze di mobilitazione del paziente con Osteogenesi Imperfetta in età pediatrica
- 7° individuazione delle migliori modalità assistenziali per neonati/bambini affetti da Osteogenesi Imperfetta già fratturati
- 8° stesura di linee guida per il personale infermieristico con indicazioni prati-

che e operative in seguito ad una meta-analisi

9° impostazione del programma per incontri di "informazione/formazione" per i genitori sul come prendersi cura del bambino

Il lavoro porterà all'elaborazione di un documento operativo (linee guida/raccomandazioni) per il personale infermieristico che opera a contatto con i bambini affetti da Osteogenesi Imperfetta in un contesto ospedaliero e che deve assicurare la mobilitazione del piccolo utente senza provocare danno. Le nozioni acquisite potranno rappresentare una risorsa anche per il care giver, in prima istanza i genitori, per migliorare la gestione quotidiana del figlio. Infatti, l'assistenza infermieristica al bambino con Osteogenesi Imperfetta sviluppa un concetto di cura centrato sulla famiglia. Ciò significa rispettare il ruolo fondamentale dei genitori nella cura dei piccoli pazienti e fornire alla famiglia conoscenze che permettano l'acquisizione di strategie per affrontare e gestire le necessità della vita quotidiana.

Il personale infermieristico e le famiglie lavorano insieme, formando un'alleanza in cui l'infermiere è il consulente e la famiglia si impegna nell'accudimento quotidiano.

Compito fondamentale dell'infermiere è quello di fornire un insegnamento globale ed un'informazione comprensibile sui temi riguardanti la cura del neonato/bambino.

Gli incontri di informazione/formazione tenuti dal personale infermieristico per i genitori rappresentano un momento fondamentale di educazione sanitaria per formare le famiglie sul miglior modo di prendersi cura del bambino. Le Linee guida elaborate potranno fornire indicazioni specifiche sulle tecniche di mobilitazione agli infermieri che lavorano in contesti ospedalieri a contatto con bambini affetti da Osteogenesi Imperfetta miglioramento la pratica infermieristica su dati Evidence Based Nursing.

Inoltre i risultati potranno essere trasferiti in ambito accademico nel corso di laurea in Infermieristica (proposta di corsi elettivi o docenza specifica nella disciplina "assistenza infermieristica in area pediatrica") ed essere presentati a corsi di aggiornamento/formazione interni all'IRCCS ed esterni, che trattano la tematica specifica. Non per ultimo, tramite le associazioni sorte nello specifico campo (As.It.O.I. -Associazione Italiana Osteogenesi Imperfetta) si potrà dare rilevanza e risonanza al lavoro svolto.

AUTISMO: DISTURBI MOTORI E ASPETTI EMBODIED DEL LINGUAGGIO**DR. MASSIMO MOLteni**

E-MAIL: MASSIMO.MOLTENI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Bosisio Parini

DESCRIZIONE

La ricerca esplora i meccanismi neurofisiologici alla base del deficit motorio nei disturbi dello spettro autistico e la possibilità che tali anomalie abbiano ripercussioni significative sulle capacità di interazione con il mondo esterno che sono alla base dello sviluppo delle competenze verbali e concettuali.

La ricerca si pone perciò due obiettivi: la prima parte della ricerca riguarda nello specifico l'analisi delle abilità motorie in questo gruppo di pazienti. Verranno investigate in particolare le capacità di mettere in atto processi di controllo attraverso l'utilizzo di feedback online durante l'esecuzione del movimento. La seconda parte della ricerca investigherà l'impatto che tale disfunzione del movimento può avere sulle abilità verbali e concettuali.

Infatti, non solo la performance motoria ha mostrato una relazione con la competenza verbale in bambini con disturbi dello spettro autistico (Mari et al., 2003; Glazebrook et al., 2006), ma, esistendo un legame fra il tipo di esperienza corporea che l'individuo mette in atto nell'interazione con il mondo esterno ed il tipo di rappresentazioni mentali che si vengono a creare (Casasanto, 2009), è possibile ipotizzare che tale tipologia di pazienti abbia anche una minore capacità di rappresentazione dei concetti astratti.

In base ai risultati della precedente ricerca TACT (FP6) ipotizziamo che nei bambini con disturbi dello spettro autistico esistano difficoltà nella messa in atto dei meccanismi di controllo del movimento che entrano in gioco nella correzione del movimento durante la sua messa in atto (Glazebrook et al., 2009)., Suddette carenze nel controllo on-line del movimento possono derivare da un disturbo nel corretto uso del feedback visivo e/o propriocettivo (Glazebrook et al., 2009) o da un deficit di integrazione di tali canali e determinano movimenti più lenti, meno accurati, e la necessità di effettuare correzioni tardive.

Nel progetto che si propone verrà valutata l'accuratezza della percezione visiva dell'orientamento degli oggetti in bambini con autismo di età prescolare (Esperimento 1), la coordinazione occhio-mano in funzione dell'orientamento degli oggetti in un compito di matching motorio eseguito con gli stessi stimoli (Esperimento 2) e la cinematica del movimento di inserimento, in cui viene manipolato l'orientamento degli oggetti. A tale scopo verrà replicato il paradigma di Gosselin-Kessiby et al., (2008) che ha messo in luce l'esistenza di automatismi di correzione on-line nei movimenti di reaching verso oggetti stazionari con diversi orientamenti.

Gli schemi motori possono essere in seguito generalizzati a situazioni astratte, poiché esiste un legame fra il tipo di esperienza corporea che l'individuo mette in atto nell'interazione con il mondo esterno ed il tipo di rappresentazioni mentali che si vengono a creare (Casasanto, 2009).

Ipotizziamo perciò che i bambini con disturbi dello spettro autistico, abbiano anche una minore capacità di rappresentarsi mentalmente i concetti astratti, e che la relazione fra tali difficoltà ed i problemi nello sviluppo del linguaggio astratto possano essere spiegati sulla base della teoria dell'embodiment.

La seconda parte della ricerca indaga l'attivazione di processi embodied da parte dei bambini con disturbi dello spettro autistico, analizzando l'esistenza di relazioni fra le abilità linguistiche legate al linguaggio astratto e le capacità sensomotorie.

Alla luce dei dati già raccolti, si è valutato opportuno allargare il campione includendo un gruppo di bambini con autismo ad alto funzionamento di età media inferiore al gruppo precedente, che non aveva mostrato significative difficoltà rispetto al gruppo di controllo, se non in un esperimento pilota sull'apprendimento di nuovi concetti astratti.

Viene somministrata la batteria già utilizzata, unitamente un nuovo compito che valuta l'acquisizione di concetti astratti indipendentemente dalle conoscenze possedute dai bambini. Le due componenti della ricerca utilizzeranno per la loro natura metodologie differenti e analizzeranno pazienti con diagnosi di autismo con età differenti: la prima parte della ricerca si pone l'obiettivo di investigare le abilità di controllo motorio prima che possano svilupparsi strategie motorie che compensino una disfunzione del processo neuro-fisiologici di monitoraggio online, a tal scopo verranno investigati bambini sotto i 7 anni di età. La seconda parte della ricerca investigherà invece la formazione di concetti astratti e i processi di embodiment, quindi riguarderà bambini con diagnosi di autismo infantile tra 8 e i 13 anni.

Attività previste*Parte A) Percezione dell'orientamento e le abilità di orientamento della mano*

nel raggiungimento di oggetti stazionari nell'autismo infantile.

Campione sperimentale:

Bambini fra i 4 e i 7 anni con diagnosi di autismo in base ai criteri del DSM-IV TR e Autistic Diagnostic Observation Schedule (ADOS), a confronto con un gruppo di bambini in assenza di patologie neurologiche e neuromotorie equiparati per età cronologica e genere.

Co-indicatori di valutazione: QI su scala WWPSI, abilità di percezione visiva e integrazione visuo-motoria su TPV (Hammil et al., 1993) e test visivo supplementare del VMI (Beery-Buktenica, 1997).

Apparato: Acquisizione optoelettronica con sistema BTS SMART a 8 telecamere con frequenza 60 Hz.

Procedura: 3 compiti sperimentali con un pannello appositamente costruito. Replicando l'esperimento di Gosselyn-Kessiby (2008) il pannello prevede due barre che possono ruotare su se stesse di 360°, poste una sopra l'altra. La barra superiore può essere sostituita da una fessura, anch'essa di orientamento variabile.

La ricerca prevede 3 esperimenti, il cui ordine di somministrazione verrà randomizzato tra i soggetti:

Esperimento 1 – Matching Percettivo. Il compito richiede di indicare verbalmente il momento di allineamento delle barre osservando il muoversi della barra inferiore mentre viene ruotata lentamente da uno sperimentatore. Sono previste quattro posizioni: 45°; 90°; 135°; 180°. Le variabili dipendenti vengono misurate attraverso registrazione OEP di marcatori passivi sulle barre girevoli e sul pannello. Vengono misurate le seguenti variabili: errore di matching per ogni singola prova; errore medio di matching per un dato orientamento; varianza errore di matching della singola prova (con direzionalità); varianza errore di matching della singola prova (valore assoluto); valore assoluto di (c).

Esperimento 2 – Matching motorio. Il compito richiede di ruotare la barra inferiore del pannello fino all'allineamento con quella superiore. Sono previste le stesse posizioni e variabili dell'Esperimento 1.

Esperimento 3 – Reaching e inserimento. Il compito richiede di inserire un oggetto di legno formato dai lati di un rettangolo (cm12x17x7,5) in una fessura leggermente più larga posizionata negli stessi orientamenti dell'Esperimento 1 e 2. Le variabili dipendenti vengono misurate attraverso registrazione OEP di marcatori passivi sul rettangolo e intorno alla fessura. Vengono misurate variabili cinematiche (momento di inizio movimento di reaching; momento di fine movimento di reaching, durata del movimento; velocità puntuale; velocità massima; numero di Movement Units; durata dei movimenti di aggiu-

stamento) e variabili di performance (errore di orientamento del rettangolo al momento di contatto con la fessura, orientamento della mano).

Risultati attesi

- Una differenza tra gruppi nell' Esp. 2 confermerebbe le anomalie motorie nell'autismo anche in un compito diverso dal reaching.
- Un matching peggiore per il gruppo clinico nell'Esp. 1 dimostrerà anomalie nella percezione dell'orientamento spaziale.
- L'entità del deficit percettivo sarà data dalla differenza tra gruppi riscontrata nell'Esperimento 1 (percettivo); l'entità del deficit motorio sarà data dalla differenza di performance motoria ottenuta nell'Esp. 2 rispetto alla baseline percettiva dell'Esp. 1.
- Le abilità di pianificazione motoria verranno calcolate correlando numero e durata dei movimenti di aggiustamento dell'Esperimento 3 con le capacità percettivo/motorie individuali tratte dall'Esp. 1 e 2.
- Se le anomalie motorie nell'autismo sono legate a deficit di controllo online del movimento, l'errore nell'inclinazione della mano registrato nella fase finale dell'inserimento rispetto all'errore nell'inclinazione della mano registrato all'inizio dell'inserimento sarà maggiore nel gruppo con autismo. Se viceversa le anomalie motorie nell'autismo sono legate a deficit di pianificazione dovremmo riscontrare una differenza significativa nell'inclinazione della mano all'inizio del movimento di inserimento ma il miglioramento di tale orientamento alla fine del movimento dovrebbe essere di pari entità qualora non esistano differenze tra i gruppi legate a diverse abilità di monitoraggio online.

Parte B) Aspetti embodied nel linguaggio dei bambini con sindrome autistica

Campione sperimentale:

Verranno valutati 8 bambini fra gli 8 e i 13 anni con diagnosi di autismo ad alto funzionamento o sindrome di Asperger effettuata in base ai criteri del DSM-IV TR e confermata dalla Autistic Diagnostic Observation Schedule (ADOS), con quoziente intellettivo nei limiti della norma, a confronto con 8 ragazzi con sviluppo tipico appaiati per genere ed età.

Esperimento 1: prova sull'acquisizione di nuovi concetti astratti. Vengono presentati in modalità visiva o verbale 10 nuovi concetti formati dall'unione di due concetti esistenti, cui è stata attribuita un'etichetta lessicale inventata. Al termine vengono presentate tre nuove immagini ed il compito dei partecipanti è quello di decidere se tali immagini rappresentano il concet-

to appena introdotto. Se la prova dovesse confermarsi efficace è prevista la preparazione di una versione dell'esperimento adattata alla somministrazione in fMRI e la conduzione di un esperimento pilota.

Esperimento 2: valutazione dello sviluppo del linguaggio

Prova di Definizioni: viene richiesta la definizione di parole concrete e astratte; compito "Odd-One-Out" si richiede di selezionare in una tripletta di parole (concrete e astratte) quella appartenente a diversa categoria di livello subordinato; test di ripetizione di frasi, tratto dalla batteria 4-12 di Fabbro (1999).

Esperimento 3: valutazione dello sviluppo sensomotorio

Prova di Stereognosi di Cinestesia dal Southern California kinesthesia and tactile perception (Ayres, 1970); test di Imitazione della posizione delle mani, e Sequenze motorie manuali tratti dalla NEPSY (Korkman et al., 1997); test del movimento fine, dalla Movement ABC (Henderson & Sugden, 1992). Abilità grafomotorie al VMI.

Esperimento 4: valutazione dei processi di embodiment

1) La prova "Letterale-Figurato" valuta la capacità di giudicare la correttezza semantica di frasi letterali e figurate, ipotizzando che nella comprensione del linguaggio figurato sia presente una componente dei processi di embodiment. Nel compito sono state utilizzate frasi dotate di significato con un oggetto concreti o astratti e frasi prive di significato. Vengono registrati accuratezza e TR.

2) La prova "Spazio-Tempo", realizzata allo scopo di verificare l'esistenza di processi di embodiment nella comprensione delle preposizioni spaziali con accezione temporale. Ai partecipanti viene chiesto di giudicare la correttezza semantica di frasi in cui vengono utilizzare preposizioni che in Italiano possono avere un'accezione sia spaziale, sia temporale (a; in; tra; intorno a; a metà).

3) La prova del "Salto", ha lo scopo di verificare l'esistenza di una associazione, acquisita tramite processi di embodiment, fra una parola ed una componente motoria. Una parola (prime) viene presentata ai partecipanti in modalità uditiva seguita dalla presentazione visiva di una animazione che compie un salto verso l'alto o verso il basso. Si richiede ai partecipanti di indicare a pulsantiera la direzione del salto. Sono state utilizzate 30 parole prime, un terzo delle quali con denotazione direzionale verso l'alto, un terzo verso il basso ed un terzo senza denotazione direzionale; metà delle parole prime sono concrete e metà astratte e possono avere una direzionalità congruente oppure incongruente rispetto al salto. Tempi di reazione più bassi nelle risposte a stimoli congruenti permetterebbero di evidenziare l'esistenza di un effetto congruenza, interpretabile come espressione del processo di

embodiment.

Risultati attesi

- L'inclusione di soggetti più giovani nel gruppo sperimentale potrebbe evidenziare difficoltà non emerse in soggetti più grandi in seguito ad effetti maturativi, di esperienza e di apprendimento, o all'insufficiente sensibilità delle prove scelte in una fascia di età superiore.
- Una differenza significativa tra gruppi limitata all'esperimento di apprendimento di nuovi concetti astratti confermerebbe la presenza di difficoltà nell'elaborazione di materiale astratto legate alla creazione di nuove strutture concettuali.
- Un deficit nella prova limitato alla modalità verbale suggerirebbe la natura linguistica delle difficoltà riscontrate; un deficit limitato alla modalità visiva potrebbe indicare l'implicazione di fattori legati ai processi di embodiment. In alternativa, una difficoltà indipendente dalla modalità di presentazione dei concetti suggerirebbe un deficit legato a meccanismi di tipo esecutivo ed inferenziale.
- Prestazioni simili nei due gruppi escluderebbero l'ipotesi di deficit a livello di embodiment nei bambini con autismo mettendo in dubbio anche la generalizzabilità delle descrizioni presenti in letteratura.

RUOLO DELLA SIMULAZIONE MENTALE DURANTE L'ELABORAZIONE LINGUISTICA

DR.SSA BARBARA TOMASINO

E-MAIL: BTOMASINO@UD.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato

Collaborazioni

SOC di Neurochirurgia, Azienda Ospedaliero Universitaria S. Maria della Misericordia di Udine, Responsabile dr. Miran Skrap

DESCRIZIONE

L'elaborazione di frasi, parole di azione o verbi che descrivono un movimento attiva, oltre alle "classiche" aree linguistiche, anche le aree motorie (e.g., Hauk et al., 2004; Tettamanti et al., 2005; Buccino et al., 2005; Oliveri et al., 2004; Tomasino et al., 2007). In particolare, il ruolo della corteccia motoria primaria (M1) in compiti linguistici rimane controverso. L'ipotesi del presente progetto di ricerca propone invece, che elaborando frasi o verbi che descrivono un movimento, i soggetti, sebbene non siano esplicitamente istruiti a immaginare mentalmente il contenuto della frase, automaticamente immaginino sé stessi o qualcun altro eseguire il movimento descritto (e.g., leggo "correre" e immagino e stesso correre, es. Tomasino et al., 2007; Tomasino et al., 2008). Una migliore comprensione dei meccanismi neurali sottostanti alla simulazione mentale durante l'elaborazione linguistica è fondamentale per la comprensione del ruolo che la teoria "embodied cognition" può giocare durante la comprensione linguistica, teoria che propone che possiamo capire le azioni dei nostri conspecifici attraverso il meccanismo dei neuroni a specchio. In questo contesto il progetto ambisce a comprendere il potere della simulazione mentale visiva e motoria.

In attesa di implementare gli esperimenti in Risonanza Magnetica funzionale, il progetto comprende studi di pazienti neurochirurgici (adulti e bambini) disegnati in modo tale da fornire delle misure in grado di evidenziare differenze funzionali tra l'esecuzione di simulazione mentale e l'esecuzione di compiti secondari non-motori durante o successivamente alla lettura e compresio-

ne di parole che descrivono movimento. I risultati degli studi pianificati potranno fornire indicazioni utili per la comprensione e l'intervento riabilitativo dei disturbi dello sviluppo e dei disturbi linguistici in pazienti cerebrolesi.

Risultati e prodotti conseguiti

In uno studio di risonanza magnetica funzionale (fMRI) (B. Tomasino, P.H. Weiss, G.R. Fink. (seconda revisione per Neuroscience). To move or not to move: a fMRI Study on Action-related Verb Processing in the Primary Motor Cortex), abbiamo mostrato che l'attivazione delle aree motorie durante elaborazione linguistica non è automatica e che il contesto linguistico in cui il materiale verbale viene presentato (es. imperativi positivi vs. negativi) modula l'attivazione cerebrale nelle aree motorie suggerendo che la simulazione motoria (o preparazione dei movimenti) più che l'elaborazione semantica del materiale verbale in sé è responsabile dell'attivazione del sistema motorio.

Evidenze a favore dell'ipotesi che la simulazione mentale di un movimento effettivamente attiva le rappresentazioni delle parti del corpo e le aree sensorimotorie provengono da un altro studio fMRI (C. Corradi-Dell'Acqua, B. Tomasino, G.R. Fink (2009). What Is the Position of an Arm Relative to the Body? Neural Correlates of Body Schema and Body Structural Description, The Journal of Neuroscience, 29(13):4162– 4171) in cui si mostra che confrontare la posizione e lateralità di un braccio mostrato in foto con il braccio appartenente al proprio corpo attiva selettivamente la corteccia somatosensoriale secondaria mentre confrontarlo con una figura standard di un corpo mostrato in un'altra foto (quindi non proprio) attiva aree che codificano la descrizione strutturale del corpo come il solco intraparietale.

Tali ipotesi sono state approfondite utilizzando l'approccio della neuropsicologia classica studiando pazienti (neurochirurgici) che presentano lesioni cerebrali selettive alle aree motorie (B. Tomasino, M. Ceschia, L. Weis, M. Skrap & F. Fabbro. (in revisione). Necessary or accessory sensorimotor areas contribution to action word processing). Lo studio consiste nell'esecuzione di un giudizio linguistico-lessicale, e uno di simulazione motoria su stimoli che descrivono movimenti di diverse parti del corpo. Taratura degli stimoli, raccolta dati sul gruppo di controllo (N=25) e rispettive analisi completata così come la raccolta dati sui pazienti neurochirurgici con lesioni alle aree motoria primaria e premotoria. I dati assieme alla ricostruzione delle lesioni e le risonanze magnetiche suggeriscono un effetto della somatotopia che si riflette sull'elaborazione linguistica dei verbi di determinate categorie di stimoli solamente nel compito di simulazione mentale motoria e non in quello linguistico. In revisione.

Conclusa la raccolta dati sul gruppo di controllo (N=10) e le analisi pazienti

neurochirurgici sottoposti ad un intervento neurochirurgico di impianto dello stimolatore come riduttore di percezione del dolore cronico neuropatico farmaco-resistente. Tale procedura viene effettuata presso la neurochirurgia di Udine. Sono stati raccolti i dati da tutti i pazienti che hanno subito tale intervento in NCH H di Udine, per un totale di n. 4 soggetti. L'esperimento consiste nell'esecuzione di due compiti (uno che richiede un giudizio linguistico-lessicale, e l'altro immaginativo di simulazione motoria). Scrittura articolo sullo in corso.

A corredo lo studio precedente concluso un esperimento sui pazienti parkinsoniani a cui è stato impiantato uno stimolatore per alleviare gli effetti della sintomatologia parkinsoniana (B. Tomasino, M. Zanier, R. Budai, M. Mondani, M. Skrap & F. Fabbro. (Submitted). To move or not to move: Subthalamic Deep Brain Stimulation effects on Action-related Verb Processing). Tale procedura viene effettuata presso la neurochirurgia di Udine. La raccolta dati su partecipanti sani (gruppo di controllo, N= 15) e sui pazienti è terminata. Le analisi a posteriori per chiarire tale interazione mostrano che il contesto, cioè presentare i verbi in contesto positivo (puoi martellare) o negativo (non scrivere) ha effetto solo quando i verbi sono di tipo motorio e finti ma non sui verbi di controllo neutrali. I dati sui pazienti parkinsoniani confermano tale risultato solo nella condizione in cui lo stimolatore è acceso. In revisione.

Uno studio successivo (B. Tomasino, E. Guatto & F. Fabbro, submitted, Do spike! Don't back one! Context-dependent effects on Sport-Specific Sentences Processing in Elite Volleyball Players) volto ad indagare il ruolo dell'esperienza sensorimotoria sull'elaborazione linguistica in atlete (pallavoliste) tifosi e inesperti che elaboravano frasi di contenuto motorio descrittive azioni tecniche della pallavolo ha mostrato una modulazione dei tempi di risposta da parte del contesto linguistico (imperative) durante l'elaborazione di frasi che descrivono movimenti possibili, reali ma non per quelle che seppur semanticamente corrette descrivono azioni impossibili, con tempi più elevati per imperativi negativi versus positivi mostrando che il contesto negativo nel nostro studio inibiva la simulazione motoria o preparazione dei movimenti.

Attività previste

- Avviare uno studio retrospettivo di analisi di dati di imaging funzionale raccolti negli ultimi 4 anni presso la neurochirurgia di Udine. La fMRI è stata svolta come studio pre-chirurgico volto a individuare prima dell'intervento neurochirurgico le aree linguistiche. Completare l'analisi del segnale fMRI durante compiti linguistici in particolare coinvolgenti verbi e compiti motori in pazienti chirurgici che si sottopongono a fMRI per studio pre-chirurgico. Viene analizzato il segnale in corteccia motoria per falsificare o conferma-

re le ipotesi di cui sopra.

- Avviare la raccolta dati per la parte di studio su pazienti neurologici che eseguiranno una batteria di test utili a studiare l'elaborazione semantica di parole e verbi di azione e la simulazione mentale dei movimenti descritti dalle frasi o parole di azione.
- Lo stesso studio sarà effettuato in sala operatoria usando la stimolazione corticale diretta di M1 e corteccia premotoria durante operazioni a paziente sveglio.

Parte di imaging funzionale (fMRI)

- Avviare le misure mediante fMRI (3T, Philips) presso Udine e le rispettive analisi fMRI. Si prevede una serie di esperimenti su volontari sani volti ad approfondire i correlati neurali coinvolti nell'elaborazione di verbi e parole che descrivono movimenti per comprendere la natura dell'interazione tra il linguaggio e il sistema motorio. Il primo studio pianificato prevede tale approfondimento in un gruppo di atleti (pallavoliste esperte) e di non esperti per verificare l'impatto dell'esperienza motoria sulle attivazioni fMRI durante l'elaborazione di frasi che descrivono movimenti.
- Si procederà poi con una serie di esperimenti fMRI pianificati ad hoc per distinguere e approfondire sotto quali condizioni (stimolo-dipendenti o compito-dipendenti) il sistema motorio può essere modulato durante elaborazione linguistica e se la simulazione mentale è necessaria alla comprensione linguistica o se piuttosto risulta essere un epifenomeno.

Riferimenti Bibliografici

Buccino, G., Riggio, L., Melli, G., Binkofski, F., Gallese, V., & Rizzolatti, G. (2005). Listening to action-related sentences modulates the activity of the motor system: a combined TMS and behavioral study. *Cognitive Brain Research*, 24 355-363.

C. Corradi-Dell'Acqua, B. Tomasino, G.R. Fink (2009). What Is the Position of an Arm Relative to the Body? Neural Correlates of Body Schema and Body Structural Description, *The Journal of Neuroscience*, 29(13):4162– 4171

Hauk, O., Johnsrude, I., & Pulvermüller, F. (2004). Somatotopic representation of action words in human motor and premotor cortex. *Neuron*, 41, 301-307.

Oliveri, M., Finocchiaro, A., Shapiro, K., Gangitano, M., Caramazza, A., & Pascual-Leone, A. (2004). All talk and no action: a transcranial magnetic stimulation study of motor cortex activation during action word production.

Journal of Cognitive Neuroscience, 16, 374-381.

Tettamanti, M., Buccino, G., Saccuman, M. C., Gallese, V., Danna, M., Scifo, P., Fazio, F., Rizzolatti, G., Cappa, S., & Perani, D. (2005). Listening to action-related sentences activates fronto-parietal motor circuits. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 17, 273-281.

Tomasino, B., Werner, C., Weiss, P.H. & Fink, G.R. (2007) Stimulus properties matter more than perspective: An fMRI study of mental imagery and silent reading of action phrases. *NeuroImage* 36 128-141

Tomasino, B., Fink, G.R., Sparing, R., Dafotakis, M., & Weiss, P.H. (2008). Action Verbs in the Primary Motor Cortex: a comparative TMS study of Silent Reading, Frequency Judgment and Motor Imagery. *Neuropsychologia*, 46, 1915-1926.

Submitted

B. Tomasino, P.H. Weiss, G.R. Fink. (seconda revisione per Neuroscience). To move or not to move: a fMRI Study on Action-related Verb Processing in the Primary Motor Cortex, *Neuroscience*, in press

Tomasino, B., Ceschia, M., Skrap, M. & Fabbro, F. Somatotopic Motor imagery and Action-related Verb Processing in Motor Areas: neuropsychological evidence.

Tomasino, B., Zanier, M., Budai, R., Mondani, M., Skrap, M. & Fabbro, F. To move or not to move: Subthalamic Deep Brain Stimulation effects on Action-related Verb Processing

B. Tomasino, E. Guatto & F. Fabbro, submitted, Do spike! Don't back one! Context-dependent effects on Sport-Specific Sentences Processing in Elite Volleyball Players.

EFFETTI PLEIOTROPICI DEI GENI DEL NEUROSVILUPPO SULLE FUNZIONI COGNITIVE E NEUROPSICOLOGICHE (DISLESSIA E DSL) E INFLUENZE NEUROFUNZIONALI COCLEARI E UDITIVE IN UNA LOGICA DI INTERAZIONE GENE-AMBIENTE

DR.SSA CECILIA MARINO

E-MAIL: CECILIA.MARINO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Servizio di Otorinolaringoiatria, Dr. Daniele Brambilla

DESCRIZIONE

La dislessia evolutiva (DE) è certamente un disturbo eterogeneo, ad eziologia complessa, di tipo genetico multifattoriale. È verosimile che un sistema oligogenico (geni a piccolo effetto che interagiscono in modo additivo) determini suscettibilità e che l'interazione con l'ambiente sia cruciale per la manifestazione clinica del disturbo.

Le evidenze sperimentali hanno identificato diverse componenti cognitive e vie neurali alla base della DE, la cui separazione in processi unici e distinti è più operativa che reale; questi processi di fatto interagiscono in un complesso network il cui funzionamento globale non è in modalità on-off, bensì lungo una gamma di performance di cui la dislessia rappresenta l'estremità negativa.

In questo contesto, è stato ampiamente dimostrato che la processazione uditiva centrale in ambiente rumoroso (speech perception-in-noise= SPIN) può essere alterata in un quadro di DE aprendo interrogativi sui possibili meccanismi eziopatogenetici.

Studi sull'uomo e su animali suggeriscono che il sistema uditivo centrale subisce importanti modifiche funzionali in epoca post-natale che dipendono dall'esperienza uditiva e che possono continuare fino a parecchio tempo dopo la nascita entro un periodo definito 'critico'. In questo scenario è comprensibile come un apparato cocleare integro nel periodo 'critico' sia

cruciale per un adeguato sviluppo del sistema uditivo centrale. Un danno cocleare, conseguente ad esempio all'esposizione ad un insulto acustico, alterando l'input ai nuclei ed alle vie in corso di sviluppo e rimaneggiamento, può avere un impatto permanente sulla struttura e sulla funzione del sistema uditivo centrale.

A livello cocleare appare cruciale il ruolo delle cellule cigliate esterne (OHC) che amplificano l'onda acustica e sono il target sensibile all'insulto acustico e il fascio olivococleare mediale (MOCB) che origina dalla porzione mediale del complesso olivare superiore e proietta sulle OHC controlaterali.

Un circuito di feedback negativo attivato dallo stimolo acustico (oltre una soglia di 15-20 dB) determina l'attivazione del MOCB, altrimenti in condizione di standby, che attraverso rilascio di acetilcolina e l'attivazione di recettori nicotinici (alfa9-alfa10) inibisce l'attività delle OHC. Il MOCB è infatti coinvolto nel controllo dinamico della soglia uditiva, nel miglioramento della percezione acustica in ambiente rumoroso e nella protezione del sistema dall'insulto acustico.

Un danno delle OHC da insulto acustico oltre ad avere un effetto diretto sulla soglia uditiva potrebbe avere implicazioni più ampie, sul sistema uditivo centrale.

La presente ricerca intende verificare se la funzionalità del sistema OHC/MOCB è alterata nella DE

I campioni di studio saranno:

- 20 dislessici
- 20 controlli normolettori

La funzionalità delle OHC verrà indagata mediante misurazione del profilo spettrale del distortion product of otoacoustic emissions (DPOAE) mentre quella del fascio olivococleare mediale (MOCB) mediante misurazione della soppressione controlaterale delle OAE.

Le OAE sono suoni prodotti dalle OHC che si propagano nell'orecchio medio e possono essere registrate nel canale uditivo esterno mediante un microfono. L'applicazione simultanea di uno stimolo acustico controlaterale all'orecchio da cui si registra determina una riduzione dell'intensità delle OAE.

Attività previste

1. Acquisto dell'apparecchio Echoport ILO292 strumento per le emissioni otoacustiche transienti e prodotti di distorsione e un PC portatile. Taratura dello strumento. 2 mesi, marzo 2010-maggio 2010
2. Selezione di campione di 20 dislessici e 20 controlli ed esecuzione di test psicometrici per inclusione. 4 mesi, gennaio 2010-maggio 2010
3. Fase sperimentale: la funzionalità delle OHC verrà indagata mediante mi-

surazione del profilo spettrale del distortion product of otoacoustic emissions (DPOAE) mentre quella del fascio olivococleare mediale (MOCB) mediante misurazione della soppressione controlaterale delle OAE. Le OAE sono suoni prodotti dalle OHC che si propagano nell'orecchio medio e possono essere registrate nel canale uditivo esterno mediante un microfono. L'applicazione simultanea di uno stimolo acustico controlaterale all'orecchio da cui si registra determina una riduzione dell'intensità delle OAE. La misurazione verrà effettuata su 40 soggetti, in un periodo di circa 20 settimane da giugno 2010. Si prevede in media di testare 2 soggetti alla settimana.

4. Informatizzazione dei dati psicometrici. giugno 2010-ottobre 2010
5. Analisi dei dati elettrofisiologici e psicometrici. ottobre 2010-dicembre 2010.

FATTORI GENETICI E AMBIENTALI - BIOFISICI E FAMILIARI - PRE-DITTIVI DELLA RISPOSTA ALLO STRESS

DR.SSA ALESSANDRA FRIGERIO

E-MAIL: ALESSANDRA.FRIGERIO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Laboratorio di biologia, Laboratorio di genetica molecolare, Bioingegneria, Servizio di Psicologia della Famiglia Salimetrics (Università della Pennsylvania e sede inglese) University of Reading (UK)

DESCRIZIONE

La risposta allo stress, oltre a dipendere dal tipo di stimolo stressante, è verosimilmente legata ad una serie di fattori biologici, propri del soggetto, sociali, legati alle condizioni di tipo relazionale e sociale che la persona può sperimentare, psicologici, legati alle competenze emozionali proprie di ciascuna persona.

Un filone di ricerca che si sta sviluppando anche nel campo della psicopatologia dell'età evolutiva riguarda l'approfondimento dei fattori biologici e ambientali che possono predire la risposta a stimoli stressanti, per ovvi motivi di prevenzione.

La ricerca che si vuole sviluppare ha come obiettivo la messa a tema di alcuni di questi aspetti attraverso due sottoprogetti distinti. Il primo rappresenta la continuazione di uno studio di follow-up, già in corso, volto ad analizzare i fattori genetici ed ambientali predittivi della risposta fisiologica allo stress, il secondo si riferisce ad un nuovo studio sui fattori predittivi dello stress genitoriale in relazione alla patologia di un figlio in età evolutiva, nel convincimento che lo stress genitoriale sia un fattore che rende meno disponibile le abilità di coping del genitore. Entrambi i progetti hanno, come obiettivo comune, la comprensione delle determinanti dello stress, sebbene il primo sia focalizzato sulla reattività fisiologica di fronte a eventi stressanti per il bambino e, il secondo, sullo stress sperimentato dai genitori di un figlio disabile. I due

sottoprogetti sono di seguito presentati separatamente.

Sottoprogetto 1 (referente: dr.ssa A. Frigerio)

Il presente sottoprogetto di ricerca, iniziato lo scorso anno, è uno studio di tipo longitudinale volto a comprendere quali siano i fattori ambientali e genetici associati a differenze individuali nella risposta allo stress dall'infanzia all'età prescolare. Un nostro precedente studio, da cui prende origine l'attuale, ha messo in luce il ruolo giocato dall'interazione tra alcuni polimorfismi (5-HTTLPR, COMT e GABRA6) e la sicurezza dell'attaccamento nell'attivazione del sistema nervoso simpatico (SNS) in un campione di oltre 100 bambini di un anno circa d'età (per una descrizione più dettagliata del precedente progetto e dei risultati conseguiti si rimanda al nostro articolo pubblicato su Journal of Child Psychology and Psychiatry - Frigerio et al., 2009). Il presente studio di follow-up si prefigge di investigare lo stesso campione a distanza di 4 anni dalla prima valutazione, attraverso procedure e metodi molto simili, al fine di valutare il potere predittivo dei fattori ambientali (qualità della relazione madre-bambino) e costituzionali (temperamento e predisposizione genetica) nella risposta allo stress in età prescolare; pertanto, lo studio potrà contribuire alla comprensione della natura delle differenze individuali legate al funzionamento dei due principali sistemi biologici - asse ipotalamo ipofisi surrene e sistema nervoso autonomo - impiegati dall'organismo per fronteggiare eventi stressanti. Nell'anno in corso si prevede di continuare la fase operativa dello studio, legata alla raccolta dei dati, attraverso il reclutamento di tutti i bambini che avevano partecipato alla prima fase della ricerca e che hanno compiuto (o compiranno nel 2010) i 5 anni.

Sottoprogetto 2 (referente: dr.ssa E. Maino)

Il carico familiare, come elemento di valutazione per la organizzazione di risposte congrue ai bisogni di gestione di una persona con disabilità, è sempre più al centro dell'interesse della ricerca scientifica del settore.

Il carico familiare trova la sua origine in diversi fattori che dipendono dalla patologia del soggetto affetto, dalla accessibilità dei servizi, dalla rete sociale di sostegno.

La patologia del soggetto affetto ha rilievo per la ricaduta in termini di stress percepito da parte del familiare, e non solo in termini di bisogno di accudimento che questo determina.

La letteratura sullo stress indica come principali caratteristiche che concorrono a rendere un evento di vita altamente stressante l'importanza, l'intensità, la durata e la non prevedibilità dell'evento stesso. Non a caso, lo stress, le sue cause e conseguenze, sono gli ambiti più indagati quando ci si interroga

sulle famiglie con un figlio con disabilità. La letteratura pone inoltre in evidenza il fatto che spesso in molti studi si parla genericamente di bambino con una disabilità o un ritardo nello sviluppo, spesso senza tener conto del tipo e della gravità della disabilità. Da più parti emerge invece l'esigenza di avere dati precisi rispetto al tipo di disabilità e alla sua gravità e a questo proposito diversi autori sottolineano come le caratteristiche di funzionamento comportamentale del bambino influenzino i livelli di stress parentale. In letteratura si è inoltre visto come i livelli di stress variano a seconda di variabili socio-demografiche e in relazione al funzionamento familiare. Il presente progetto di ricerca è volto pertanto ad indagare i fattori predittivi dello stress in relazione alle caratteristiche della patologia di un figlio in età evolutiva e alle caratteristiche socio-demografiche dei nuclei familiari considerati.

Risultati e prodotti conseguiti

Sottoprogetto 1

Durante lo scorso anno abbiamo effettuato: a) uno studio pilota in cui abbiamo sperimentato, in un piccolo campione, il protocollo ed, in particolare, la nuova procedura osservativa per la valutazione dell'attaccamento in età prescolare, la metodica per la valutazione dell'attività cardiaca e la compliance dei bambini rispetto alle valutazioni proposte; b) la valutazione di un campione di coppie madre-bambino che avevano partecipato alla prima fase dello studio e i cui bambini avevano compiuto i 5 anni di età. In sintesi, grazie allo studio pilota condotto su 10 coppie madre-bambino, siamo riusciti a testare la procedura di Marvin e Cassidy seguendo le indicazioni forniteci da uno degli autori (Prof. Robert Marvin) e le metodiche di rilevazione dei parametri fisiologici legati alla risposta allo stress; per quanto riguarda invece lo studio vero e proprio abbiamo ri-valutato 37 bambini e analizzato i dati preliminari relativi alla risposta del cortisolo salivare, dell'alpha amylase salivare e dei parametri cardiaci (frequenza cardiaca e RSA) in relazione allo stress della separazione dalla madre ed in funzione di alcune variabili comportamentali. Per una estesa descrizione dei risultati conseguiti lo scorso anno, si rimanda alla relazione ministeriale finale del progetto di ricerca (RC. 3.11).

Attività previste

Sottoprogetto 1

Di seguito, si riporta una breve sintesi degli obiettivi e della metodologia impiegata nella ricerca (per una descrizione più approfondita si rimanda alle relazioni ministeriali dello scorso anno – RC 3.11). Sinteticamente, lo studio mira a ri-testare lo sviluppo del bambino dal punto di vista a) della qualità

della sua relazione di attaccamento alla madre, b) comportamentale e c) biologico per poter comprendere meglio i fattori coinvolti nella risposta psicofisiologica allo stress dall'infanzia all'età prescolare.

Campione

Il campione sarà costituito da tutti i bambini che avevano partecipato al precedente progetto di ricerca e che, nel corso del 2010, compiranno i 5 anni (N = 58) di età, i cui genitori daranno il loro consenso scritto per la partecipazione allo studio. Sulla base delle percentuali di adesioni ottenute finora (80% dei soggetti contattati), si prevede il reclutamento di circa 45 bambini che, sommati a quelli valutati lo scorso anno, formeranno un campione di circa 80 bambini.

Strumenti

Scheda su eventi stressanti. Alla madre verrà richiesta la compilazione di una scheda per verificare l'eventuale presenza di eventi stressanti intercorsi nella vita del bambino tra il tempo zero (primo assessment) e il tempo 1 (momento attuale della rivalutazione).

Versione prescolare della Strange Situation. L'attaccamento del bambino alla madre verrà valutato attraverso la versione prescolare della Strange Situation (Cassidy & Marvin, 1992). Similmente alla versione per l'infanzia della Strange Situation (SS) (Ainsworth et al., 1978), la versione prescolare consiste di episodi di separazione e riunione con la madre.

Child Behavior Checklist/ 1 ½ - 5. La CBCL/1½-5 (Achenbach e Rescorla, 2000) è un questionario compilato dai genitori che permette di valutare vari problemi emotivo-comportamentali, sia di tipo internalizzante sia esternalizzante, in bambini di età compresa tra 1½ e 5 anni.

Children's Behavior Questionnaire. Nel presente studio le madri compileranno la forma breve del CBQ (Rothbarth et al., 2001), tradotta e validata in Italia da Giada Matricardi dell'Università di Padova, che comprende 15 scale che indagano diverse dimensioni temperamentali legate all'Affettività Negativa, all'Estroversione e alla Capacità di Controllo.

Assessment psicofisiologico

Scheda informativa per l'assessment psicofisiologico. Le madri dovranno compilare un'apposita scheda per raccogliere informazioni su fattori come il sonno, il cibo, le condizioni fisiche e le esperienze quotidiane del bambino che possono interferire con i livelli di cortisolo e alpha amylase.

Raccolta e analisi del cortisolo e dell'alpha amylase salivare. La raccolta della saliva verrà effettuata attraverso una cannucchia in cui i bambini devono sputare fino a riempire una fialetta criogenica in 5 diversi momenti: all'arrivo in laboratorio dopo un breve periodo (circa 15 minuti) di ambientazione, subito prima, 5 - 20 e 40 minuti dalla fine dell'evento stressante (versione

prescolare della Strange Situation). Le analisi verranno effettuate in base a un kit specificatamente studiato per la misurazione quantitativa del cortisolo (HS-Cortisol kit, Salimetrics) presso l'IRCCS E.Medea e dell'alpha amylase salivare (Salivary alpha amylase assay kit, Salimetrics) presso il laboratorio Salimetrics in Inghilterra.

Registrazione attività cardiaca.

La registrazione dell'attività cardiaca verrà condotta in due momenti prima (baseline) e per tutta la durata della procedura stressante per la valutazione dell'attaccamento in età prescolare, tramite il dispositivo ProComp5 Infinity (Thought Technology), in grado di trasmettere i segnali acquisiti in tempo reale tramite un modulo Bluetooth al PC dedicato alla rilevazione dei dati, visualizzati con l'ausilio della suite Biograph Infinity. Ciascun bambino indosserà 3 elettrodi monouso posizionati secondo le derivazioni di Einthoven (sulle estremità destra e sinistra del torace, sotto la linea clavicolare, e sopra l'ombelico). Dai picchi R verrà ricavato il periodo cardiaco (Heart Period, HP), espresso poi sottoforma di Frequenza Cardiaca (Heart Rate, HR) in battiti/minuto. Utilizzando l'intervallo tra due picchi R consecutivi come segnale si otterrà il valore di RSA (Respiratory Sinus Arrhythmia), calcolato attraverso il metodo di Porges.

Sottoprogetto 2

Gli scopi del lavoro sono quelli di rilevare:

1. se esistono, come è spesso riportato in letteratura (Hoppes, Harris, 1990; Erikson e Upshur, 1989; Seltzer et al., 1993; Saviolo Negrin, Cristante, 1994), livelli diversi di stress in rapporto alle caratteristiche del figlio con handicap (ad esempio, Quoziente Intellettivo, condotte internalizzanti, versus condotte esternalizzanti, gravità e tipo di disabilità);
2. se e come il livello di stress varia tra padre e madre, visto che in letteratura ci sono risultati contrastanti a tal proposito (Rousey et al., 1992; Bailey et al., 1992; Krauss, 1993);
3. se e in che modo alcune variabili socio-demografiche (ad esempio sesso ed età dei figli, status economico, livello culturale ed età dei genitori) possono essere predittori o moderatori dello stress genitoriale.

Metodo

Partecipanti e protocollo di ricerca

Per la realizzazione di tale studio si prevede il reclutamento di circa 100 genitori di bambini ricoverati in regime di day-hospital o tempo pieno presso l'IRCCS "E. Medea".

Ai partecipanti verrà somministrato il protocollo già in uso presso il servizio di Psicologia della Famiglia per l'attività di valutazione delle dinamiche familiari. Tale protocollo comprende i seguenti strumenti:

- 1) Parenting Stress Index –Short Form (Abidin, 1985; adattamento italiano a cura di Guarino, Di Blasio, D'Alessio, Camisasca, Serantoni, 2008)
- 2) Una scheda per rilevare alcuni dati di tipo socio-anagrafico

In aggiunta al protocollo di valutazione già in uso, si terrà conto della diagnosi effettuata dal medico di riferimento dei bambini ricoverati secondo i criteri dell'ICD-10, del Quoziente Intellettivo e degli strumenti, previsti dai protocolli già in uso, a seconda della patologia del bambino (ad esempio, CBCL, ADOS, Vineland ecc.).

Risultati attesi

Considerato l'impatto che lo stress esercita sulla salute dell'individuo, i risultati di entrambi i progetti possono avere ricadute in ambito clinico e scientifico.

I risultati del primo progetto, considerata la sua natura longitudinale, potranno fornire informazioni significative sul ruolo giocato dai fattori biologici, ambientali e dalla loro interazione nel determinare il diverso modo in cui i bambini rispondono allo stress nel corso del tempo. In altre parole, lo studio ci aiuterà a comprendere meglio se la risposta ad un evento stressante sperimentata dal bambino nell'infanzia permane anche in età prescolare e quali sono i fattori che contribuiscono o meno alla sua permanenza. In questo modo, ci attendiamo che i dati provenienti da questo studio possano avere implicazioni utili per interventi di prevenzione. Per quanto riguarda il secondo progetto, le ricadute sull'attività clinica sono connesse alla possibilità di mettere a punto interventi a sostegno delle risorse familiari, genitoriali in particolar modo, finalizzati ad aiutare i genitori a meglio comprendere e gestire le caratteristiche della disabilità del figlio, diminuire i livelli di stress e favorire un miglior adattamento. Le ricadute sull'attività scientifica sono rappresentate dalla possibilità di evidenziare i fattori predittivi dello stress genitoriale differenziandoli a seconda della patologia del figlio e di variabili ambientali.

INDIVIDUAZIONE DI INDICATORI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI PRECOCI IN BAMBINI IN ETÀ PRESCOLARE CON RITARDO O ASSENZA DELLE ABILITÀ LINGUISTICHE E SOCIO-COMUNICATIVE: UNO STUDIO LONGITUDINALE

DR. ANGELO MASSAGLI

E-MAIL: ANGELO.MASSAGLI@OS.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Ostuni

DESCRIZIONE

Gli obiettivi della ricerca sono:

1. confermare attraverso l'analisi degli home video quanto rilevato nella letteratura internazionale rispetto alla rilevazione di indicatori precoci diagnostici nell'autismo;
2. individuare e confrontare le variabili socio-comunicative oggetto di studio in quadri clinici diversi: disturbi pervasivi dello sviluppo e disfasia evolutiva;
3. valutare la possibilità, attraverso un'osservazione longitudinale, di individuare parametri inerenti sia alle traiettorie evolutive degli indicatori precoci che alla loro differenziazione.

Materiali e metodo

Il campione è costituito da tutti i bambini di età prescolare afferenti al nostro Istituto con assenza o ritardo del linguaggio verbale e con penalizzazione delle abilità socio-comunicative. Essi sono sottoposti ad una valutazione multidisciplinare (valutazione neuropsichiatrica infantile, psicolinguistica, psicologica e neuropsicologica) finalizzata alla diagnosi. Si sono individuate 2 categorie diagnostiche: Disturbi Pervasivi dello Sviluppo (comprendenti Disturbo Autistico e DPS NAS) e Disturbi Specifici del Linguaggio di tipo Misto. Si è elaborata una check-list di codifica creata ad hoc per siglare le variabili oggetto dello studio. Lo schema di codifica degli indicatori dei comportamenti socio-comunicativi che noi abbiamo applicato ha fatto riferimento alla: Communication Checklist by Wetherby e Prizant (1989), alla Early Social Communication Scales (ESCS) (Mundy, 2003) e alla Grid for the Study of

Normal Behaviors in Infants and Toddlers through Home Movies. (Maestro, 2001). I dati sono raccolti attraverso videoregistrazioni in 3 tempi diversi: T0, primo anno di vita (home video), T1 (3-4 anni) quando arrivano in valutazione per la prima visita e T2 dopo 6 mesi – quando tornano per il follow-up. Le codifiche degli indicatori individuati attraverso i filmati (home video, video della 1 visita e video del follow-up) sono effettuate in termini di frequenza e durata attraverso l'Observer XT.7 (Noldus 2007), software specifico per l'osservazione e la misurazione del comportamento. I codificatori sono stati addestrati alla somministrazione della nostra griglia di codifica attraverso l'utilizzo di video di bambini sia patologici che con sviluppo tipico (questi ultimi esclusi dal presente studio), allo scopo di acquisire competenza e dimestichezza nei processi di codifica e identificare correttamente gli item. I codificatori sono in cieco rispetto alla diagnosi dei bambini. Il training è stato completato e ciascun codificatore ha ottenuto un accordo soddisfacente (Cohen's Kappa $\geq 0,8$) con un clinico esperto. L'analisi dei dati sarà effettuata mediante test statistici. Un'analisi sequenziale sarà eseguita per la rilevazione di possibili correlazioni.

Risultati e prodotti conseguiti

- Sono stati raccolti tutti i consensi informati da parte dei genitori prima dell'arruolamento
- È stata raggiunta una discreta numerosità del campione (50 soggetti, di cui 23 con home video)
- Sono stati analizzati e catalogati gli home video secondo criteri già utilizzati in letteratura (per evento, per durata, per presenza di momenti di interazione reciproca)
- Sono stati codificati tutti i dati raccolti sinora, creando apposite griglie con l'utilizzo del software Observer XT.7

Attività previste

- Aumentare la numerosità del campione fino ad arrivare ad almeno 50 soggetti con home video
- Procedere con follow up a T2
- Avviare analisi statistiche

I SUBSTRATI MORFOFUNZIONALI E GENETICI DELLE PRE-PSICOSI: UNO STUDIO MULTIMODALE CON RMN

DR. PAOLO BRAMBILLA

E-MAIL: PAOLO.BRAMBILLA@UNIUD.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pesian di Prato

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Poli Regionali dell'IRCCS "E. Medea", IRCCS "E. Medea" UDGEE di Udine, Centro di Riabilitazione "La Nostra Famiglia" di Pesian di Prato e di San Vito al Tagliamento IRCCS "E. Medea"

Unità di Neuroimmunologia, IRCCS San Raffaele, Milano

Clinica Psichiatrica, Università degli Studi di Udine

Department of Psychiatry and Behavioural Neuroscience, University of Texas at Houston

DESCRIZIONE

Il progetto prevede tre fasi: una retrospettiva di analisi epidemiologica dell'archivio dei bambini con psicopatologia; una baseline/prospettica di rivalutazione di codesti bambini da un punto di vista comportamentale e genetico; ed una sperimentale di imaging durante la quale codesta coorte di bambini verrà sottoposta a risonanza magnetica morfologica e funzionale e ad approfondimenti neuropsicologici

In questo senso intendiamo studiare mediante un'applicazione multimodale di Risonanza Magnetica i substrati morfo-funzionali in soggetti ad alto rischio clinico di sviluppare psicosi maggiori e correlarli, in un'ottica multidisciplinare, con indici genetici, neuropsicologici e immunologici.

Esploreremo la connettività cerebrale che sottende le capacità immaginative da un punto di vista (1) anatomico mediante RM strutturale e diffusion tensor imaging (DTI), (2) biochimico mediante RM spettroscopica (MRS) e (3) dinamico mediante Risonanza Magnetica funzionale (fMRI).

Approfondiremo inoltre la componente genetica, cercando di identificare come i geni di suscettibilità alla malattia possano modulare la comparsa di sintomi psicopatologici in relazione all'interazione con l'ambiente sociale e familiare in cui il bambino/ragazzo si sviluppa; inoltre verrà indagato come

l'assetto genetico in interazione con l'ambiente possa portare ad eventuali patologie di connettività della sostanza bianca e del pensiero immaginativo che si riflettono poi sul comportamento del ragazzo.

Infine, completeremo lo studio correlando i dati di imaging ad un'approfondita valutazione (a) neuropsicologica e (b) immunologica ottenendo informazioni sull'assetto di citochine e chemochine, quando possibile.

La possibilità di correlare dati imaging, genetici, neuropsicologici e immunologici in una popolazione ad alto rischio clinico per psicosi rappresenta un'opportunità unica per studiare le interazioni di gene e ambiente sul neurosviluppo cerebrale, permettendo di caratterizzare i meccanismi neurobiologici che sottendono il disturbo del pensiero nelle psicosi maggiori e che portano all'espressione della malattia. La correlazione delle informazioni di neuroimaging funzionale con le prestazioni comportamentali potrà fornire indicazioni utili per la comprensione e l'intervento riabilitativo delle psicosi in pazienti psichiatrici.

Il progetto prevede lo svolgimento di una serie di esperimenti con lo scopo di indagare i diversi livelli della simulazione mentale.

Obiettivi primari

- identificare se anomalie della connettività e del pensiero immaginativo rappresentino marker endofenotipici in bambini e adolescenti ad alto rischio clinico di sviluppare psicosi
- esplorare quali aree e quali vie di comunicazione supportano deficit dell'immaginazione in questa popolazione
- studiare come la componente genetica possa modulare le caratteristiche morfofunzionali delle prepsicosi
- determinare come le anomalie morfofunzionali cerebrali possano influenzare lo sviluppo del sé, del linguaggio e dell'attaccamento in questa popolazione
- determinare come i fattori socio-ambientali e familiari modulino l'influenza dell'assetto genico nel determinare l'esordio, la persistenza e le caratteristiche psicopatologiche e neuro funzionali delle prepsicosi in una coorte di bambini e adolescenti problematici.

Obiettivi secondari

- seguire in modo longitudinale i pazienti a rischio e ri-eseguire la RM a distanza di 3 e 5 anni per studiare i cambiamenti dei marker morfofunzionali durante il neurosviluppo
- stabilire le basi per creare un servizio di prevenzione sulle psicosi presso

l'IRCCS "E. Medea"

- implementare metodologie per futuri studi su gemelli, di epigenetica e CNV
- esplorare il ruolo dell'asse immunologico nel sostenere anomalie di connettività nelle pre-psicosi

Risultati e prodotti conseguiti

È stato definito il paradigma sperimentale a cui verranno sottoposti i soggetti durante la Risonanza Magnetica. Si tratta di un disegno misto 2 x 2 x 2, avente i seguenti fattori:

1 Gruppo (between subjects): soggetti prepsicotici vs normali

1 Compito (within subjects): imagery vs letter detection

1 Stimolo (within subjects): verbi emotivi vs verbi motori

Allo scopo di selezionare i 50 verbi (25 emotivi-25 motori) da inserire nel compito, è stato costruito un questionario di taratura per diverse variabili psicologiche che nella primavera del 2009 è stato somministrato a circa 550 studenti tra gli 8 e i 18 anni, reclutati presso istituti scolastici del Friuli. Attualmente le risposte di 500 questionari sono state inserite in una banca dati da cui verranno scelti i verbi da presentare ai soggetti, tenendo conto delle seguenti variabili rilevate:

- età di acquisizione
- arousal
- valenza
- immaginabilità

Fase di raccolta dati retrospettiva

a - Definizione del protocollo di raccolta dati

Dopo una prima visione delle cartelle di entrambi gli Istituti partecipanti al primo anno di ricerca (IRCCS polo Friuli e polo Bosisio Parini), è stata preparata una griglia con tutte le informazioni da recuperare durante la consultazione delle cartelle cliniche in archivio.

I criteri per il recupero sono stati:

- una presenza di uno o più questionari CBCL
- età compresa fra 6 e i 19 anni
- ricovero tra gennaio 2003 e dicembre 2008

Criteri di inclusione: i soggetti inseriti nello studio dovevano rientrare nelle seguenti diagnosi ICD-10:

- Disturbi comportamentali ed emotivi con esordio tipico in infanzia e in adolescenza (F90-F98)

- Ipercinetici (F90)
- Condotta (F91)
- Condotta-emotivi (F92)
- Emotivi (F93)
- Tic (F95)
- Altri (F98)
- Schizofrenia, Disturbo schizotipico, Disturbo delirante (F20-F29).
- Disturbi dell'umore (F30-F39).
- Disturbi di personalità (F60-F69)

I criteri di esclusione sono stati i seguenti:

- diagnosi di disturbi linguaggio
- ipovisione
- ritardo mentale
- Autismo e Sindrome di Asperger
- epilessia
- lesioni cerebrali
- i disturbi apprendimento senza comorbidità con disturbo del comportamento o dell'emotività

Le informazioni generali che sono state raccolte per ciascun soggetto, dove presenti, sono le seguenti:

- informazioni anagrafiche: nome, cognome, sesso, data di nascita
- diagnosi e informazioni sul ricovero: diagnosi ICD-10; ICD 9CM; data ricovero, tipologia di ricovero
- Familiarità per disturbi mentali
- Peso alla nascita e complicanze ostetriche pre- e perinatali, tipologia di parto
- Terapie farmacologiche
- Riabilitazione psicologica: psicoterapia; sostegno psicologico, counseling ai genitori, parent training ai genitori; psicomotricità
- Altra riabilitazione: logopedia, training per disturbi apprendimento
- Informazioni sulla famiglia: professione e scolarità dei genitori; stato civile dei genitori e tipologia di famiglia; età e sesso del fratello; ordine di genitura
- Eventuali altri disturbi pregressi nel linguaggio, nella deambulazione, nel ritmo sonno-veglia, nell'alimentazione e nel controllo degli sfinteri

Inoltre sono stati raccolti i punteggi numerosi dei seguenti test:

- Punteggi t e punteggi grezzi delle scale delle competenze, scale sindromiche, scale di problematicità globale e scale DSM- oriented dei questionari CBCL, TRF e YSR.

- Diagnosi DSM –IV dell'intervista clinica strutturata KSAD-P
- Punteggi grezzi a tutte le sottoscale e gli indici globali dei questionari SCOD e CONNERS nelle versioni compilate dai genitori, dall'insegnante e dall'adolescente
- Punteggio globale e delle sottoscale al questionario CDI
- Punteggi alle sottoscale del questionario SAFA
- Quoziente intellettivo
- Punteggi ottenuti alle prove di apprendimento: lettura, scrittura e calcolo
- Batteria sulla dislessia e disortografia
- Batteria per l'esame del linguaggio

Unità Operativa di Bosisio Parini

Sono stati recuperati tutti i questionari CBCL inseriti nel database dell'Unità Operativa di Bosisio Parini dal gennaio 2003 a dicembre 2008 per un totale di 995 questionari.

I questionari recuperati sono stati poi incrociati con i bambini ricoverati in reparto NR2 sia in regime di Day Hospital che Tempo Pieno sempre nello stesso periodo.

In questo modo è stato definito il campione di cartelle da visionare in archivio pari a 438 soggetti per un totale di 502 questionari

Successivamente circa 50 soggetti sono stati ulteriormente esclusi perché visionando la cartella sono emersi dei criteri di esclusione. Il campione totale dell'unità operativa di Bosisio Parini è pari a circa 380 soggetti .

Unità Operativa di Udine-Pasian di Prato

Sono stati individuati tutti i soggetti seguiti tra il 2003 e il 2008 con diagnosi presente nei criteri di inclusione (circa 1200). Di ognuno questi è stata presa visione la cartella medica, allo scopo di inserire nello studio solo i soggetti per cui era stata compilata almeno una scala CBCL o YSR. In totale, sono stati individuati 674 soggetti che avevano almeno una scala CBCL e soddisfacevano sia i criteri di inclusione che di esclusione.

Creazione database comune per l'inserimento dei dati

E' stato creato un database informatico in cui sono stati inseriti i dati raccolti in entrambe le sedi. Sono stati finora inseriti in database i dati relativi a tutti i 674 soggetti della sede di Udine e 350 soggetti della sede di Bosisio Parini.

Analisi preliminari fase retrospettiva

A fine 2009 è stato possibile effettuare delle analisi preliminari sul campione inserito fino a quel momento in database (n=808). I dati sono stati presentati

in due conferenze:

1 AIPP (Associazione Italiana Prevenzione Psicosi), Genova, 26-27 novembre
1 Convegno: Disturbo Bipolare: su e giù dal treno delle emozioni, Udine, 4 dicembre

Le analisi hanno rivelato una predominanza di soggetti maschili nel campione (75%). Inoltre, le diagnosi più frequenti nel campione sono quelle di disturbi emozionali (40%) e di ADHD (21%).

E' stata effettuata anche una prima analisi esplorativa sui risultati delle scale CBCL che ha rivelato la presenza di elevati punteggi alla scala internalizzante nel gruppo di bambini con disturbi di tipo emotivo, mentre i bambini con disturbi di condotta e ADHD mostrano punteggi più elevati alla scala esternalizzante.

Definizione del protocollo del modulo Base

Dopo un' esame attento della letteratura, abbiamo definito il protocollo operativo della successiva fase Base. Nello specifico, il modulo Base prevede la compilazione da parte del bambino/ragazzo di alcuni questionari di approfondimento dei sintomi emotivo-comportamentali, una batteria di questionari per i sintomi di psicosi e pre-psicosi e un' intervista strutturata per una diagnosi DSM-IV o ICD-10. Inoltre al genitore che accompagna il bambino/ragazzo verrà chiesto di compilare alcuni questionari inerenti i problemi emotivo-comportamentali del figlio, un questionario sul suo comportamento e su quello del partner/coniuge e una scheda per raccogliere delle informazioni sociodemografiche.

Nello specifico il protocollo è così articolato:

Test da somministrare al ragazzo:

- Wechsler Intelligence Scale for Children - WISC-III (Sattler, 2001) per valutazione del quoziente intellettivo.
- Questionario sul comportamento del giovane Anni 11-18 (Youth Self Report di Thomas M. Achenbach -2001)
- Questionario sul temperamento e il carattere dei bambini/ragazzi (Junior Temperament and Character Inventory –JTCI- Versione 2 , 1995)
- Questionario uso/abuso tabacco, droghe e alcool (SCICA revised 12-18 anni- Achenbach 2001)
- Intervista strutturata DAWBA (Development And Well-Being Assessment, Goodman 2000)
- Batteria di test per valutare i sintomi di psicosi composta dai seguenti questionari: Perceptual aberration scale-junior (Eckblad & Chapman,

1983) , Magical ideation scale –junior (Edell & Chapman, 1980), Hypomanic personality scale-junior (Eckblad, & Chapman, L. J. 1986)

- Valutazione degli stili e comportamenti genitoriali (Parental Bonding Instrument, Parker et al., 1979; Favaretto et al., 2001)
- Questionario di preferenza manuale (Edinburgh Inventory for handedness)
- Scala dello sviluppo puberale , Petersen

Test per il genitore che accompagna il bambino/ragazzo:

- Questionario sul comportamento del bambino - Anni 6-18 (Child Behavior Checklist for Ages 6-18 di Thomas M. Achenbach - 2001)
- Questionario sul comportamento dell' adulto - Anni 18-59 (Adult Self Report- Adult Behavior Checklist for Ages 18-59 di Thomas M. Achenbach – 2003) riferito a sé stesso e al patner
- Questionario per i genitori (Parent Problem Checklist)
- Scheda sociodemografica: composizione nucleo familiare, scolarità e professione attuale dei genitori
- Intervista strutturata DAWBA

Attività previste

- Analisi dei dati inseriti nel database inerenti la prima fase di raccolta dati retrospettiva in una prospettiva epidemiologica osservazionale che permetta di descrivere le relazioni tra le varie dimensioni psicopatologiche osservate alla CBCL e le modalità diagnostiche categoriali utilizzate nei diversi centri. Tale analisi permetterà inoltre una valutazione delle patologie psichiche maggiormente osservabili nell'ambito della realtà ospedaliera italiana, dando adito a diverse possibili pubblicazioni di interesse nazionale ed internazionale.

- Rivalutazione dei bambini identificati nella prima fase di screening delle cartelle cliniche in base al protocollo di seguito descritto e articolato nei diversi moduli

In questa fase verranno richiamati i ragazzi ed i loro genitori presso le sedi IRCCS dove saranno rivalutati dagli operatori in base alle attività previste in base al Modulo Base

In questa fase verrà inoltre proposta la raccolta del materiale genetico sia al bambino che ad entrambi i genitori e quando possibile ai fratelli come indicato dal Modulo 2 Genetica.

Verrà inoltre valutata la possibilità di aderire al Modulo 1- Risonanza Magnetica e/o Modulo 3 - Neuropsicologia che verranno svolti in successivi appuntamenti.

- Estensione del protocollo di valutazione retrospettiva ai Poli di San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato, Conegliano e Pieve di Soligo, Ostuni
Ai suddetti Poli sarà trasmesso il protocollo di valutazione delle cartelle cliniche presso l'archivio consentendo quindi una raccolta dati omogenea per i diversi centri reclutatori e la messa a punto di un protocollo di indagine condiviso tra i diversi centri.

Materiali e metodi

Campione

Nell'arco di tre anni saranno reclutati 45 pazienti con alto rischio clinico di sviluppare psicosi di età compresa tra gli 8 e i 22 anni, in grado di dare un consenso informato alla partecipazione allo studio direttamente o mediante consenso fornito dai genitori. Parallelamente, saranno reclutati 45 partecipanti volontari sani comparabili per età, scolarità e sesso in grado di dare un consenso informato alla partecipazione allo studio o mediante consenso fornito dai genitori.

Verrà proposta a tutti i ragazzi la possibilità di effettuare studi di genetica e di ereditabilità reclutando anche fratelli e genitori dei pazienti.

Protocollo di Valutazione

La ricerca si compone di un modulo base di approfondimento clinico necessario per essere reclutato nella ricerca e di altri 3 moduli tra loro complementari ma non mutuamente esclusivi, cui il paziente può decidere di aderire in modo completo (tutti e tre i moduli) oppure incompleto (primo, secondo o terzo modulo). Nello specifico, il modulo base prevede interviste di approfondimento dei sintomi e del comportamento di circa 3 ore; il primo modulo prevede l'esecuzione di una risonanza magnetica della durata di circa 1 ora; il secondo modulo prevede un prelievo ematico (o salivare) per analisi genetiche ed infiammatorie al ragazzo ai genitori e quando possibile ai fratelli; il terzo modulo prevede test neuropsicologici della durata di circa 2 ore.

Modulo Base

Nello specifico il protocollo è così articolato:

Test da somministrare al ragazzo:

- Wechsler Intelligence Scale for Children - WISC-III (Sattler, 2001) per valutazione del quoziente intellettivo.
- Questionario sul comportamento del giovane Anni 11-18 YSR (Youth Self Report di Thomas M. Achenbach -2001)

- Questionario sul temperamento e il carattere dei bambini/ragazzi J-TCI (Junior Temperament and Character Inventory - Versione 2 , 1995)
- Questionario uso/abuso tabacco, droghe e alcool SCICA revised 12-18 anni (Achenbach 2001)
- Intervista strutturata DAWBA (Development And Well-Being Assessment, Goodman 2000)
- Batteria di test per valutare i sintomi di psicosi composta dai seguenti questionari: PAS (Perceptual aberration scale-junior, Eckblad & Chapman, 1983), MIS (Magical ideation scale –junior, Edell & Chapman, 1980), HPS (Hypomanic personality scale-junior, Eckblad, & Chapman, L. J. 1986)
- Valutazione degli stili e comportamenti genitoriali PBI (Parental Bonding Instrument, Parker et al., 1979; Favaretto et al., 2001)
- Questionario di preferenza manuale (Edinburgh Inventory for Handedness)
- Scala dello sviluppo puberale Petersen
- Beck/Children's Depression Inventory - BDI
- C-GAS
- Conners per ADHD

Test per il genitore che accompagna il bambino/ragazzo:

- Questionario sul comportamento del bambino - Anni 6-18 CBCL (Child Behavior Checklist for Ages 6-18 di Thomas M. Achenbach - 2001)
- Questionario sul comportamento dell' adulto - Anni 18-59 CBCL (Adult Self Report- Adult Behavior Checklist for Ages 18-59 di Thomas M. Achenbach – 2003) riferito a sé stesso e al partner
- Questionario per i genitori PPC (Parent Problem Checklist)
- Scheda sociodemografica: composizione nucleo familiare, scolarità e professione attuale dei genitori
- Intervista strutturata DAWBA

Modulo 1- Risonanza Magnetica

- Sarà effettuata una scansione di risonanza magnetica
- RM strutturale e diffusiva: mira ad indagare i substrati anatomici e micro-strutturali della connettività cerebrale mediante 3D e DTI. Sequenze anatomiche: successivamente si eseguirà una sequenza 3D MPR secondo il piano assiale (TR 2060, TE 3.93, NEX 1, SLI 144, MATR 192X256, THIK 1mm, FOV 256; durata di acquisizione=7':32'', totale delle acquisizioni morfologiche= 14:30 min) per ottenere immagini coprenti l'intero cervello. Sequenze DTI: trenta direzioni di gradiente con b value di 1000 s/mm², un'immagine senza pesatura in diffusione con b= 0. TR/TE 2800/77; FOV, 230 mm; spessore/numero delle fette: 5mm/19. Un totale di tempo di acquisizione di circa 4 min.

- RM spettroscopica: studiare la componente biochimica delle aree cerebrali di interesse, quali i lobi prefrontali e le strutture limbiche, avendo informazioni sulla funzionalità neuronale tramite le concentrazioni di N-acetil aspartato, sul metabolismo di membrana tramite la creatina, la colina e il mio-inositolo, e sulle componenti neurotrasmettitoriali tramite glutamato, glutamina e GABA. Sequenze Spettroscopiche (CSI): FOV 240x240, matrix 16x16, TR=1.5, TE= 80, bandwidth 2000, data point 2048, averages 4, elliptical (nominal voxel 1.5x1.5x2.0). Unsuppressed water: matrix 8x8, averages 2, TR=1.5 sec, elliptical. Le sequenze CSI verranno analizzate come precedentemente mostrato dal nostro gruppo (Brambilla et al. 2002; Brambilla et al. 2005b; Brambilla et al. 2005c; Brambilla et al. 2004b) (Andreone et al. 2007b; Baiano et al. 2008; Brambilla et al. 2004a; Brambilla et al. 2003).
- RM funzionale: indagare il sistema di aree cerebrali e il tipo di elaborazione coinvolti nella simulazione mentale. Ai partecipanti saranno presentati verbi motori ed emotivi nella forma infinita. Verrà loro richiesto di immaginare di compiere quell'azione (compito di imagery) oppure di individuare una lettera all'interno della parola scritta (compito di letter detection). I dati di neuroimmagine funzionale saranno analizzati con programmi appositi (e.g., SPM5) e saranno condotte analisi basate su Regioni di Interesse e su tutto il cervello. Sequenze funzionali (< 30 min): single-shot gradient echo, echoplanar imaging (EPI), ogni volume EPI contiene 36 fette assiali (TR = 2200 ms, TE = 30 ms, FOV = 200.36 mm, matrix: 64 x 64; slice thickness of 3 mm, 90° flip angle, voxel size: 3.1 x 3.1 x 3.3 mm) precedute da 6 scan dummy per permettere allo scanner di raggiungere lo steady state. I dati di neuroimmagine verranno correlati con i dati comportamentali acquisiti online durante le misure fMRI e daranno conferma diretta di come ogni singolo soggetto abbia elaborato ogni singolo stimolo (es. come motorio od emotivo). I dati comportamentali verranno analizzati con programmi appositi (e.g., SPSS) e inseriti come repressori nel modello stimato durante l'analisi dei dati imaging.

Modulo 2- Genetica

- Analisi Genetica: Un prelievo di sangue oppure di saliva sarà ottenuto per estrarre il DNA secondo procedure standard dal ragazzo, dai genitori e dove possibile dai fratelli. Verranno condotte delle analisi genetiche sui geni codificanti per strutture del SNC ed evidenziati come importanti o associati alla suscettibilità a sviluppare sintomi psicopatologici connessi con le psicosi o la depressione. I polimorfismi selezionati saranno analizzati con una o più tecniche di biologia molecolare (RFLP, VNTR, SNPs, STRP)

o direttamente attraverso la determinazione di sequenze specifiche che utilizzano un sequenziatore automatico ABI PRISM 310.

- Espressione Genica Immunologia: prelievo ematico di circa 10 ml sarà raccolto in contenitori addizionati di EDTA. Il siero sarà ottenuto dopo centrifugazione e conservato a -20°C. Un Real-time PCT (Taqman® system) verrà effettuato per valutare i livelli di mRNA di diversi marker immunologici, comprese le chemochine, i recettori delle chemochine, le citochine, gli auto-anticorpi ed uno screening virologico. Il campione ematico verrà conservato ed analizzato presso l'Unità di Neuroimmunologia dell'Istituto Scientifico Universitario San Raffaele di Milano.

Modulo 3- Neuropsicologia

- Funzioni esecutive: AX-CPT, IGT
- Linguaggio: vignette, TCGB, Papagno, ascolto dicotico, prosodia
- Per valutare inoltre quanto eventuali alterazioni siano correlate con deficit nell'integrazione sensorimotoria saranno somministrati i test del Dominio Sensorimotorio e Visuo-Spaziale della NEPSY-II (Korkman et al., 2007).

SINDROMI EPILETTICHE CRIPTOGENICHE ASSOCIATE O MENO A COMPROMISSIONE NEUROLOGICA: ASPETTI NEUROFISIOPATOLOGICI E DI GENETICA MOLECOLARE

DR. CLAUDIO ZUCCA

E-MAIL: CLAUDIO.ZUCCA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Sperimentale

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Bosisio Parini

Tipo di ricerca

Corrente

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: UO NR1 (Responsabile: Dr. R. Borgatti) e Laboratorio di Genetica molecolare (Responsabile: Dr.ssa M.T. Bassi) del Polo di Bosisio Parini Servizi di Neurofisiopatologia dei Poli di Conegliano e Pieve di Soligo (Dr. P. Bonanni), S. Vito al Tagliamento e Pasi di Prato, ed Ostuni (Dr. A. Trabacca)

DESCRIZIONE

La Ricerca Corrente 2008 e 2009 dell'U.O. di Neurofisiopatologia del polo di Bosisio Parini dell'IRCCS "E. Medea" è stata dedicata allo studio di alcune forme di epilessie (E) criptogeniche con particolare riguardo agli aspetti neurofisiopatologici e genetici.

È noto che almeno nel 20-30% dei pazienti affetti da E (in alcune casistiche fino al 50%) l'eziologia rimane imprecisata (E criptogeniche o presumibilmente sintomatiche secondo l'ultima proposta di classificazione). Nella nostra casistica (62% circa di pazienti con età inferiore ai 18 anni, 42% con associata insufficienza mentale) l'eziologia del quadro rimane tuttora sconosciuta nel 40% dei casi.

Alcuni lavori (1, 2, 3) hanno sottolineato come E criptogeniche con quadri neuroradiologici normali o aspecifici sia di età infantile che adulta possono essere associati a mutazioni di geni che codificano per subunità dei canali ionici di membrana.

Se nelle cerebropatie criptogeniche con associate manifestazioni parossistiche (epilettiche e non) il dato neuroradiologico si conferma poco significativo, quello neurofisiologico (in particolare EEG-poligrafico) può rivelarsi utile non solo per individuare le strutture nervose coinvolte dalla malattia, ma anche per orientare l'indagine genetico-molecolare più idonea (considerando i geni non solo codificanti canali ionici ma anche altre proteine coinvolte

nell'epilettogenesi) .

Nel corso di questo studio nel 2009 sono stati sottoposti ad indagini di biologia molecolare (principalmente ricerca di mutazione di SCN1A), dopo aver rivisto i dati clinici e neurofisiologici, 19 casi di cui 15 pazienti e 4 familiari, sospettando una forma genetica a distribuzione familiare. Abbiamo riscontrato in 3 casi mutazioni a carico del gene SCN1A, in 2 pazienti e in 1 familiare, inoltre in 2 familiari sono stati riscontrati polimorfismi.

Attualmente nell'ambito della diagnostica molecolare anche la tecnica CGH-array (array-based comparative genomic hybridization), oltre a MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), si è rivelata utile nell'individuazione di sindromi epilettiche associate a canalopatie, in particolare per delezioni o duplicazioni di SCN1A (4, 5), ma anche duplicazione di GABBR1 (6) e delezione di CHRNA7 (7). È stato proposto pertanto da alcuni autori (5) di sottoporre a CGH-array i pazienti con sindromi SMEI-like e note dismorfiche risultati negativi alla ricerca di mutazione in SCN1A.

Bibliografia

Harkin LA, McMahon JM, Iona X, et al. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain*. 2007 Mar;130(Pt 3):843-52.

Jansen FE, Sadleir LG, Harkin LA, et al. Severe myoclonic epilepsy of infancy (Dravet syndrome): recognition and diagnosis in adults. *Neurology*. 2006 Dec 26;67(12):2224-6.

Berkovic SF, Harkin L, McMahon JM, et al. De-novo mutations of the sodium channel gene SCN1A in alleged vaccine encephalopathy: a retrospective study. *Lancet Neurol*. 2006 Jun;5(6):488-92.

Marini C, Scheffer IE, Nabbout R et al. SCN1A duplications and deletions detected in Dravet syndrome: implications for molecular diagnosis. *Epilepsia* 2009 Mar; 11 [Epub ahead of print]

Davidsson J, Collin A, Olsson ME et al. SCN1A duplications and deletions detected in Dravet syndrome: implications for molecular diagnosis. *Epilepsy Res* 2008 Sep; 81(1): 69-79.

Andrieux J, Richebourg S, Duban-Bedu B, et al. Characterization by CGH-array of an interstitial de novo tandem 6p21.2p22.1 duplication in a boy with epilepsy and developmental delay. *Eur J Med Genet*. 2008 Jul-Aug; 51 (4): 373-81

Chen CP, Lin SP, Tsai FJ, et al. A 5.6-Mb deletion in 15q14 in a boy with speech and language disorder, cleft palate, epilepsy, a ventricular septal defect, mental retardation and developmental delay. *Eur J Med Genet*. 2008 Jul-Aug; 51 (4): 368-72.

Risultati e prodotti conseguiti

- Cryptogenic Epileptic Syndromes Related to SCN1A, *Arch Neurol*.
- Mutazioni di SCN1A in un caso di epilessia temporale con sclerosi dell'ipocampo e familiarità per convulsioni febbrili, *Boll Lega It Epil*.
- A novel mutation in CACNA1A segregates in a family with SCA6, EA2 and FHM1 *J of Neurol Neurosur Psych*. (in press)
- Mutazione di SCN1A in un caso di sindrome di Lennox-Gastaut con pregressa sindrome di West ad eziologia sconosciuta, *Boll Lega It Epil*.

Attività previste

Obiettivi

Proseguire il reclutamento di pazienti e sottoporre a nuove indagini come CGH-array i pazienti risultati negativi alle analisi precedenti
Completare lo studio delle caratteristiche cliniche e neurofisiopatologiche dei casi in cui è stata identificata una mutazione.

Risultati attesi

1. Individuazione di cause genetiche di sindromi epilettiche associate o meno a compromissioni neuro-psichiche attualmente considerate criptogeniche.
2. Individuazione di nuove mutazioni geniche responsabili di sindromi epilettiche.
3. Precisazione delle caratteristiche non solo cliniche ma anche neurofisiopatologiche che possono essere indicative di questo tipo di eziologia dell'epilessia.
4. L'analisi delle caratteristiche neurofisiopatologiche di questi pazienti permetterà una più precisa correlazione tra genotipo e fenotipo

STUDIO CLINICO-ELETTROENCEFALOGRAFICO ED EVOLUZIONE PROGNOSTICA DELLE EPILESSIE SINTOMATICHE CON CRISI A TIPO SPASMI CON ESORDIO NELLA PRIMA INFANZIA

DR. ANTONIO TRABACCA

E-MAIL: ANTONIO.TRABACCA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Sperimentale

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2010

Polo scientifico

Ostuni

DESCRIZIONE

Gli spasmi infantili sono una forma di epilessia ad esordio nella prima infanzia (generalmente entro i primi 2 anni di vita) con incidenza pari a 1/3225 nati vivi (Frost and Hrachovy 2005).

È caratterizzata da una sintomatologia critica e da un pattern EEG critico ed intercritico ben definito, con associata alterazione dello sviluppo psicomotorio. Le crisi sono del tipo motorio e sono caratterizzate da improvvise, simultanee e simmetriche contrazioni di gruppi muscolari del capo, del tronco e degli arti della durata di circa 1 secondo con conseguenti movimenti in flessione e/o in estensione. Possano manifestarsi anche in modo asimmetrico. Nel 70-80% dei casi si presentano in cluster ed usualmente si associano ad altri fenomeni critici di difficile individuazione (subtle spasms) come fenomeni di staring, risveglio improvviso, deviazione oculare, pause respiratorie, fenomeni autonomi. L'EEG intercritico è nella maggior parte dei casi caratterizzato da un quadro di ipsaritmia, sebbene possa anche essere assente, che si interrompe durante l'evento critico. Nel 2004, è stato istituito un Consensus Statement (West Delphi Group) che ha dato nuove indicazioni rispetto ai criteri classificativi, etiologici e di management degli spasmi epilettici. Allo stato dell'arte, nessuna delle molte condizioni morbose predisponenti è stata associata in maniera univoca e invariabile al manifestarsi degli spasmi. La variabilità e non specificità delle condizioni morbose predisponenti si contrappone alla sostanziale specificità delle caratteristiche cliniche ed elettroencefalografiche dell'epilessia a tipo spasmi infantili e all'età d'esordio.

Lo studio clinico-elettroencefalografico con evoluzione prognostica dell'epilessia a tipo spasmi infantili, avviato nel 2008, ha dato modo di osservare la variabilità della eziologia in questa forma di epilessia, le stimme comu-

ni elettroencefalografiche, ma anche le eccezioni che correlano agli spasmi anche se in frequenza più rara; inoltre l'osservazione del quadro di RMN encefalo può dare sostegno alle varie ipotesi di epilettogenesi. In merito alla frequenza delle crisi, alla loro evoluzione in forme farmacoresistenti o al controllo dell'epilessia, farmacologicamente o in modo spontaneo, occorre un tempo di osservazione più lungo che consenta, specie per i pazienti di età inferiore ai due anni, di uscire dall'epoca tipica in cui si manifestano gli spasmi, per poter affermare come l'epilessia con spasmi si è evoluta e, se presente, come si è evoluta la coesistente epilessia con crisi diverse dagli spasmi. Inoltre occorre un periodo di follow-up maggiore anche per la verifica dell'efficacia e della necessità dei farmaci antiepilettici utilizzati.

Risultati e prodotti conseguiti

Il nostro studio, clinico-osservazionale, di tipo retrospettivo, si propone di studiare una popolazione di pazienti con epilessia a tipo spasmi infantili ad etiologia sintomatica ed in particolare le caratteristiche cliniche-elettroencefalografiche, le diverse condizioni morbose associate interessanti l'encefalo, la risposta alla terapia farmacologica e l'evoluzione clinica ad un follow-up di 24 mesi dall'esordio e all'arruolamento (coincidente con il reclutamento allo studio) allo scopo di individuare una eventuale correlazione tra i dati etiologici, clinici ed EEG all'esordio e il tipo di risposta alla terapia e l'evoluzione clinico-elettroencefalografica di questa forma di epilessia. Nel nostro studio abbiamo voluto abbracciare i criteri di studio proposti dal consensus statement del West Delphi Group ed esaminare una popolazione selezionata di pazienti con spasmi infantili sintomatici, determinati da encefalopatie di certa etiologia e dal corso non progressivo.

Il campione è costituito da pazienti in età evolutiva, affetti da epilessia a tipo spasmi infantili, ad etiologia sintomatica, reclutati consecutivamente presso il nostro reparto tra il 30 Gennaio 2008 ed il 30 novembre 2008 e dal 30 Gennaio 2009 al 30 Novembre 2009.

Abbiamo a tutt'oggi reclutato 34 pazienti affetti da Epilessia a tipo Spasmi Epilettici ad etiologia sintomatica con cerebrolesioni congenite o acquisite di natura non progressiva. Il 40% del campione è composto da maschi (15) e il 60% da femmine (19). Al reclutamento, avevano un'età compresa tra 2 e 20 anni con età media di 8,55 anni (DS \pm 5,40).

La maggior parte dei pazienti del nostro campione (82.4%) ha presentato un esordio classico degli spasmi tra i tre ed i dodici mesi, Il 58.8% dei nostri pazienti ha presentato la Sindrome di West, con la sintomatologia tipica di spasmi in cluster e quadro EEG intercritico ipsaritmico, il 41.2% dei pazienti ha presentato spasmi infantili in cluster senza ipsaritmia. Nel nostro campio-

ne c'è una sostanziale omogeneità tra la percentuale di pazienti che hanno presentato spasmi in flessione (47%) e pazienti che hanno presentato spasmi in estensione (35.3%), con solo il 14.7% di spasmi asimmetrici. Nessuna correlazione significativa è stata d'altronde evidenziata tra la semiologia degli spasmi e le altre variabili esaminate, confermando il dato già segnalato in letteratura rispetto all'assenza di una relazione specifica tra semiologia degli spasmi ed etiologia sottostante (Lux et al. 2006). Non distante da quanto segnalato in letteratura rispetto alla storia naturale degli spasmi infantili che parla per il 20% dei pazienti di risoluzione del quadro clinico a distanza di 1 anno dall'esordio (Jeavons PM 1961), nel nostro campione il 38.3% era libero da spasmi ad un follow-up di 12 mesi dall'esordio. A 24 mesi il 47.1% del nostro campione era libero da spasmi. All'arruolamento, il 61.8% dei pazienti del nostro campione era libero da spasmi.

Il 20.6% dei nostri pazienti non ha mai presentato altro tipo di crisi oltre agli spasmi. Il restante 79.4% ha sviluppato altre tipi di crisi con esordio ad un'età media di 12.3 mesi: il 55.8% ha presentato altre crisi in contemporanea agli spasmi o con esordio entro tre-sei mesi, il 23.5% ha sviluppato altro tipi di crisi dopo l'esordio degli spasmi (con esordio entro i primi quarantotto mesi di vita). Tali dati confermano quanto segnalato in letteratura: Goldestein et al (2008) riportano che il 63,3% del loro campione presentava associate agli spasmi altre crisi di varia semiologia (tonico-cloniche, parziali, toniche, mio-cloniche) in assenza di una specifica associazione.

Nel nostro campione, il 76.4% presentava un quadro ipsaritmico dato che trova in letteratura valori molto variabili (tra il 7% ed il 75% secondo Alva-Moncayo E 2002; 58% secondo Dulac O 1993). Già a distanza di un anno dall'esordio degli spasmi la percentuale di pazienti con tracciato ipsaritmico si riduceva al 14.7% al 12° mese e al 4% al 24° mese. Tale dato conferma quanto riportato in altri studi rispetto alla scomparsa del pattern ipsaritmico dopo i primi anni di vita, probabilmente per maturazione dei sistemi neurotransmettitori e delle connessioni sottocortico-corticali con la comparsa di un'attività più sincrona e simmetrica (Kellaway P 1983). La presenza di un tracciato ipsaritmico all'esordio rappresenta un fattore prognostico sfavorevole per un' alta frequenza di crisi di altra semiologia sia all'esordio che al 12° mese, come già segnalato da altri autori (Jeavons et al 1961; Kramer et al 1997). L'ipsaritmia potrebbe infatti essa stessa essere considerata uno stato bioelettrico patologico e come tale causa di irreversibili mutazioni neurofunzionali. La precoce sparizione dell'ipsaritmia correla d'altronde con una buona evoluzione delle crisi (Riikonen R 1996).

Nel nostro studio, la persistenza di EEG non organizzato all'arruolamento, anomalie EEG molto attive a 12 mesi e all'arruolamento sono fattori significativamente indicativi di una cattiva prognosi relativa allo sviluppo cognitivo

(rilievo di ritardo mentale grave), dato segnalato già in letteratura (Saltik S 2002) e che conferma quanto già noto rispetto all'impatto negativo della persistenza di attività epilettiforme molto attiva sulle funzioni cognitive fino ad un deterioramento mentale (Jayakar PB 1991).

Sono stati individuati numerosi pattern EEG critici correlati all'evento spasmo epilettico (Fusco L et al 1993; Haga et al 1995; Watanabe et al. 2001): complessi di onde lente ad alto voltaggio bilaterali, sincrone ed asincrone, prevalenti sulle regioni anteriori presenti nel 100% dei casi; burst di onde rapide che possono presentarsi da soli o seguire il complesso di onda lenta e riportati in percentuali che vanno dal 50% (Fusco L. et al. 1993) al 62% (Haga et al. 1995); decremento dell'attività che è presente dopo uno spasmo clinico ed è descritto nel 69% (Fusco L. et al. 1993) e nel 62% (Haga et al 1995) dei casi. Vengono anche segnalate anomalie del tipo punte e complessi punta-onda ad alto voltaggio (Gaily et al 2001; Fusco L et al 1993). Solo per il 52.9% dei nostri pazienti sono stati registrati con metodica elettroencefalografica gli episodi critici del tipo spasmi: nel 100% dei soggetti si sono registrati ampi potenziali lenti di-trifasici generalizzati, nel 26.1% burst di attività rapida, nel 35.3% decrementi dell'attività. Nell' 82.3% si sono osservate punte focali precedenti il potenziale lento di ampio voltaggio. La disparità dei nostri dati rispetto a quanto segnalato in letteratura è certo da attribuirsi alla difficoltà di reperire retrospettivamente tutte le informazioni relative ai pattern EEG correlati all'evento critico.

Il 38.2% dei pazienti già assumeva farmaci antiepilettici prima dell'esordio degli spasmi, mentre il 61% ha avviato precocemente un trattamento farmacologico specifico.

Il 52.9% ha ricevuto un trattamento monoterapico, con prevalenza d'uso del vigabatrin, il 47.1% un trattamento politerapico. Ad un mese dall'inizio della terapia antiepilettica, il 62.6% dei pazienti continuava a presentare crisi pluri-quotidiane, il 26.5% erano seizure-free.

In conclusione, dai dati fin qui raccolti emerge una sostanziale sovrapposizione da quanto emerso relativamente alle caratteristiche cliniche-etologiche-EEG dei pazienti con epilessia del tipo spasmi infantili di origine sintomatica da noi esaminati e quanto già presente in letteratura. Nello specifico, abbiamo riscontrato un outcome sfavorevole per i soggetti con esordio precoce, con elevata frequenza di crisi all'esordio e scarsa risposta alla terapia farmacologica, presenza del quadro di ipsaritmia e persistenza di crisi molto frequenti al 12° e al 24° mese dall'esordio. L'outcome sfavorevole rispetto alla frequenza delle crisi e alla possibilità di una corretta maturazione del pattern EEG oltre che la persistenza di anomalie EEG molto attive condiziona negativamente anche lo sviluppo cognitivo. La stratificazione del nostro campione relativa all'etiologia sottostante può aver determinato un bias rispetto

all'outcome cognitivo (netta prevalenza dei soggetti con ritardo mentale) e neuromotorio.

Rispetto all'etiopatogenesi, i nostri dati confermano quanto già emerso in letteratura circa l'estrema variabilità di anomalie morfo-strutturali (corticale, sottocorticali) sottostanti il manifestarsi degli spasmi epilettici; ciò non sembra apportare alcun dato aggiuntivo rispetto alle diverse ipotesi etiopatogenetiche formulate rispetto all'etiologia degli spasmi, cioè la dicotomia tra quanti ritengono che l'etiopatogenesi sia da ricercare in una ben definita anomalia strutturale (Goldstein J et al 2008) e quanti ritengono che la patofisiologia degli spasmi epilettici sia in realtà da imputare ad un aspecifico meccanismo neuropatologico, comune a tutte le condizioni morbose predisponenti (Mischel and Vinters 1997).

Attività previste

Obiettivo della continuazione dello studio è quello di ampliare la casistica già in nostro possesso e di poter osservare i pazienti per un periodo di almeno tre anni come suggerito dal West Delphy Group (2004). Il campione continuerà a essere costituito da pazienti affetti da epilessia a tipo spasmi infantili ad etiologia sintomatica giunti in osservazione nella sede di Ostuni dell'Associazione La Nostra Famiglia -IRCCS "E. Medea".

Per ogni paziente, in base alle indicazioni del West Delphy Group (2004), verranno raccolte e valutate le seguenti variabili: caratteristiche socio-demografiche; dati relativi alla storia pre-perinatale; classificazione delle condizioni morbose interessanti l'encefalo associate; età d' esordio dell'epilessia (esordio precoce, classico, tardivo); caratteristiche cliniche degli spasmi (spasmi simmetrici, asimmetrici, subtle spasms); classificazione del tipo di crisi presenti al follow-up a 3 anni secondo i criteri ILAE (1989); caratteristiche elettroencefalografiche ictali e non ictali ricavate con EEG di superficie (tracciati in veglia, tracciati in sonno N-REM e quando possibile video-EEG) all'esordio, dopo avvio del trattamento specifico e a distanza (follow-up a 3 anni); dati relativi allo sviluppo psicomotorio precedente e successivo all'esordio degli spasmi epilettici, dopo avvio del trattamento specifico e a distanza (follow-up a 3 anni); dati relativi alla terapia farmacologica (intervallo di tempo tra esordio degli spasmi ed introduzione della terapia antiepilettica, tipo di trattamento farmacologico utilizzato all'esordio e a distanza); risposta alla terapia (risposta clinica all'esordio e a distanza).

Tali dati verranno successivamente sottoposti ad analisi di correlazione statistica con lo scopo di individuare eventuali fattori clinici-etilogici-EEG predittivi dell'evoluzione di tale forma di epilessia.

Dall'esame dei dati già ottenuti, il rilievo di un danno della sola sostanza bian-

ca individuato nel 29.5% dei casi e la presenza di danni associati della grigia e della bianca nei restanti ci ha suggerito un approfondimento in merito al possibile ruolo etiopatogenetico della sostanza bianca nell'epilettogenesi, dato confermato da recenti studi condotte con le nuove tecniche di RMN (DTI) e pubblicate negli ultimi anni (Hutchinson E 2009; Rugg-Gunn FJ 2001; Eriksson S H 2001).

Con tale obiettivo, nella terza fase del nostro studio, oltre che ad ampliare la casistica e proseguire nel follow-up, stileremo un protocollo per effettuare studi neuroradiologici con nuove tecniche di RMN (DTI) al fine di individuare eventuali alterazioni specifiche della sostanza bianca in pazienti con un buon outcome clinico e in pazienti con persistenza di crisi del tipo spasmi epilettici.

RICERCA DI MICRODELEZIONI CON ARRAY-CGH IN PAZIENTI CON EPILESSIA E FENOTIPI SINDROMICI

DR. PAOLO BONANNI

E-MAIL: PAOLO.BONANNI@CN.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Sperimentale

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

DESCRIZIONE

L'epilessia è una delle più gravi e frequenti malattie neurologiche in età evolutiva. Studi di popolazione hanno evidenziato che la prevalenza dell'epilessia nel bambino è circa 5/1000 nei paesi sviluppati. L'eziologia dell'epilessia è frequentemente multifattoriale ma i fattori genetici sono responsabili di circa il 40% delle epilessie. Le forme geneticamente determinate includono sia quelle idiopatiche, monogeniche o poligeniche, o le forme sintomatiche/criptogenetiche nelle quali il disturbo epilettico avviene in un paziente con altre caratteristiche come il ritardo mentale, disturbo del comportamento/autismo, dimorfismi multipli e anomalie congenite della corteccia cerebrale. Questi quadri sindromici possono essere presenti nel contesto di sindromi ereditate con meccanismo mendeliano o risultare da anomalie cromosomiche. Si tratta di situazioni che hanno una frequenza che varia tra il 6% e il 50 % in pazienti in cui è associato ritardo mentale e/o anomalie congenite multiple. Nella maggior parte di questi soggetti tuttavia gli studi di tipo citogenetico sono negativi. La tecnica del array CGH (Comparative Genomic Hybridisation) permette di definire a livello molecolare i riarrangiamenti cromosomici e di investigare la presenza di anomalie cromosomiche criptiche non reperibili tramite le classiche tecniche di tipo citogenetico. È sempre meglio evidente che le delezioni/duplicazioni criptiche, anche note come copy number variations (CNVs), possono spiegare la causa genetica in quei pazienti con un fenotipo sindromico nei quali la mappa cromosomica è normale.

Risulta quindi evidente che attualmente la tecnica più promettente per scoprire delezioni/duplicazioni criptiche associate a specifiche forme di epilessia è l'array CGH. L'applicazione di questa tecnica potrebbe rivelare nuovi hotspots per la scoperta di geni dell'epilessia.

Risultati e prodotti conseguiti

Nel corso del 2009 sono stati selezionati dalla commissione di esperti 10 pazienti che corrispondevano ai criteri di reclutamento (epilessia focale criptogenetica) per lo studio genetico. È in corso l'analisi genotipo/fenotipo.

Attività previste

1. riunioni collegiali con i colleghi di Bosisio, Ostuni e Udine al fine di scegliere i pazienti candidati all'analisi genetica (dobbiamo reclutare almeno altri 10 pazienti);
2. effettuazione dell'esame
3. elaborazione dei risultati

DEFINIZIONE DELLE ECCITABILITÀ CORTICALE NEI SOGGETTI EMICRANICI ADULTI E BAMBINI MEDIANTE STUDIO DEI POTENZIALI EVOCATI SOMATOSENSORIALI

DR. SERGIO.ZANINI

E-MAIL: SERGIOZANINI@PP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4
Neurofisiopatologia Clinica e
Sperimentale

Tipo di ricerca
Corrente

Periodo di svolgimento
2010

Polo scientifico
San Vito al Tagliamento e Pasion di
Prato

Collaborazioni

Dipartimento di Neuroscienze, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
Servizio di Neuropsichiatria Infantile, ASS4 "Medio Friuli", Udine
Dipartimento di Neurologia. Az. Ospedaliero-Universitaria, Udine

DESCRIZIONE

Da almeno un decennio in letteratura sono stati proposti due modelli della eccitabilità corticale nei soggetti adulti emicranici (i bambini sono stati studiati molto poco ed i dati sono pressoché aneddotici): il primo sostiene la presenza di una ipereccitabilità della corteccia cerebrale quale correlato fisiopatologico di base della patologia, mentre il secondo sostiene la presenza di una ipoeccitabilità della corteccia cerebrale. Questa discordanza fra i dati di letteratura dipende in larga misura dalle metodologie di studio usate. Infatti, mentre gli autori che sostengono il primo modello hanno principalmente indagato direttamente la eccitabilità corticale mediante stimolazione sensoriale, rilevando come questa fosse effettivamente ipereccitabile al singolo stimolo sensoriale, coloro che sostengono il secondo modello hanno indagato principalmente la capacità della corteccia di rispondere in maniera eccitatoria a treni di stimolazione sensoriale ripetuti nel tempo, dimostrano la precoce saturabilità della risposta corticale (espressione di ipoeccitabilità) oppure hanno indagato le attività tonica inibitoria sulla corteccia cerebrale di strutture sottocorticali (essenzialmente il talamo). Infine, fonte di variabilità di dati sperimentali viene dal fatto che i soggetti emicranici sono stati studiati confrontando le risposte di eccitabilità corticale confrontando il periodo intercritico (periodo lontano da crisi emicraniche) con il periodo pericritico (periodo immediatamente precedente e immediatamente successivo alla crisi emicranica).

Tuttavia, all'interno del periodo pericritico, è ragionevole pensare, alla luce della fisiopatologia della crisi emicranica, che le risposte corticali siano differenti fra la fase immediatamente precedente alla crisi emicranica (quando il cervello inizia a perdere la sua omeostasi elettrica) ed il periodo immediatamente successivo alla crisi emicranica (quando il cervello ha "scaricato" il suo disequilibrio elettrico mediante la crisi emicranica stessa), in analogia con quanto succede nelle crisi epilettiche.

Attività previste

Il presente progetto di ricerca presenta la seguente metodologia di studio ed il seguente disegno sperimentale.

Criteri di inclusione

Diagnosi di emicrania con aura, emicrania senza aura secondo i criteri ICHD 2004.

Criteri di esclusione

Terapia farmacologica in atto per prevenzione di emicrania. Sarà invece consentita l'assunzione di farmaci per l'attacco, secondo le modalità di assunzione (tipo di farmaco e dosaggio) usuali per il paziente.

Reclutamento dei pazienti

I pazienti proverranno dagli ambulatori dedicati alla cura delle cefalee dei tre Istituti reclutanti (IRCCS Medea, Servizio di NPI ASS4 Medio Friuli, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine). Ai potenziali candidati identificati in base alla presenza, preferibilmente, di un pattern emicranico di ricorrenza temporale relativamente stabile e predicibile (vedi infra), verrà consegnato un modulo di Diario della Cefalea preparato ad hoc per questo studio, ed un modulo di adesione al progetto di ricerca e di consenso informato.

Numerosità delle campionature

Al termine dello studio, sarà necessario avere 3 gruppi così composti: 35 soggetti adulti con diagnosi di emicrania con aura, 35 soggetti adulti con diagnosi di emicrania senza aura, e 70 soggetti normali di pari età (pazienti senza storia di emicrania).

Successivamente lo studio recluterà soggetti di età evolutiva, pazienti e soggetti normali di pari età, con campionature analoghe a quelle degli adulti per esigenze di analisi statistica alla luce della metodologia di studio (SEPs) e con le medesime diagnosi cliniche.

Qualora fosse possibile ampliare ulteriormente la numerosità del campione,

sarà possibile anche differenziare sottogruppi di pazienti in base alla frequenza della ricorrenza delle crisi emicraniche (es. <4/mese, 4-8/mese, >8/mese). Ciò potrebbe essere di grande interesse in quanto il comportamento dell'eccitabilità corticale degli emicranici è verosimile che sia differente a seconda che le crisi siano frequenti od infrequenti.

Esami sperimentali neurofisiologici

I soggetti saranno sottoposti a esami neurofisiologici di potenziali evocati somatosensoriali. Verranno studiati 3 volte: nel periodo intercritico, nel periodo pericritico immediatamente precedente alla crisi emicranica (entro le precedenti 24 ore) e nel periodo immediatamente successivo alla crisi emicranica (entro le successive 24 ore).

Verranno studiati i potenziali evocati nella loro componente di proiezioni talamo-corticali mediante analisi delle High Frequency Oscillations (HFO), nelle risposte corticali dopo doppio stimolo e nelle risposte corticali dopo stimolazioni prolungate.

Questa metodologia di studio, insieme alla discriminazione dei 3 periodi (intercritico – condizione elettrica corticale basale, pericritico precedente la crisi – condizione di perdita di equilibrio elettrico corticale, e pericritico – condizione di depressione post-crisi dell'equilibrio elettrico corticale) dovrebbe verosimilmente permettere di definire in maniera accurata la fenomenologia della soglia di eccitabilità corticale nei soggetti emicranici adulti e in età evolutiva. La durata dell'esame neurofisiologico è di circa 1 ora complessiva (1 h per ogni periodo di studio – intercritico, pericritico pre-, pericritico post-emicrania).

Modalità e tempistica di esecuzione degli esami neurofisiologici

I pazienti verranno chiamati per esecuzione programmata degli esami sulla base del diario delle cefalee. In questo modo sarà facilmente identificata la data di esecuzione dell'esame nel periodo intercritico.

Per quanto riguarda l'esecuzione dell'esame neurofisiologico nei periodi pericritico pre- e post-emicrania, i pazienti chiameranno il Servizio di Neurofiopatologia dell'IRCCS Medea (sede di esecuzione degli esami) e prenoteranno l'esecuzione dell'esame, in base alla ricorrenza della crisi emicranica (esame nel periodo pericritico post-emicrania – emicrania appena verificatasi), ed in base presenza di sintomi prodromici o di probabile imminente ricorrenza della crisi in base alla periodicità identificata dal diario (esame nel periodo pericritico pre-emicrania).

L'esecuzione degli esami seguirà un disegno quadratico latino (1/3 dei soggetti, pazienti inizierà la serie di esami nel periodo intercritico e successiva-

mente eseguirà gli esami, in ordine, nel periodo pericritico pre-emicrania e nel periodo pericritico post-emicrania, 1/3 dei pazienti inizierà la serie nel periodo pericritico pre-emicrania e successivamente eseguirà gli esami, in ordine, nel periodo pericritico post-emicrania e nel periodo intercritico, 1/3 dei pazienti inizierà la serie di esami nel periodo pericritico post-emicrania e successivamente eseguirà gli esami, in ordine, nel periodo intercritico e nel periodo pericritico pre-emicrania), per evitare fenomeni spuri e confondenti di apprendimento.

I PROCESSI DI FISSIONE E FUSIONE MITOCONDRIALE E RUOLO DELLE ALTERAZIONI BIOENERGETICHE A LORO SUSSEGUENTI NELLE PATOLOGIE DEGENERATIVE DEL SISTEMA MUSCOLARE E NERVOSO

PROF. EMILIO CLEMENTI

E-MAIL: EMILIO.CLEMENTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5
Neurobiologia

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Laboratorio di Biologia Molecolare e U.O. NR3 del Polo di Bosisio (Dr.ssa Maria Teresa Bassi e Dott.ssa Grazia D'Angelo)
Dipartimento di Scienze Precliniche e Dipartimento di Biologia, Università di Milano
University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland
Istituto di Neuroscienze, Consiglio Nazionale delle Ricerche Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Milano-Bicocca
The Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London

DESCRIZIONE

Molte delle forme di degenerazione muscolare e neuronale sono accompagnate da difetti metabolici dovuti ad alterazioni della funzionalità mitocondriale. Due osservazioni fanno pensare a che difetti nei processi di fissione e fusione mitocondriale possano avere un ruolo importante in questo alterato metabolismo, e che questo alterato metabolismo abbia conseguenze dirette sui processi degenerativi stessi. La prima linea di evidenze origina da nostri studi, condotti nel corso della ricerca corrente dell'anno 2009. Questi studi hanno dimostrato che a livello del muscolo scheletrico i processi di fissione e fusione mitocondriale controllano il differenziamento muscolare e possibilmente la sua capacità rigenerativa. Abbiamo inoltre dimostrato che i mitocondri quando sono in stato fissionato hanno una disfunzione metabolica latente. Infine abbiamo dimostrato che un mediatore chiave sia nel tessuto muscolare che nervoso, il nitrossido (NO), interagendo con la proteina fissionante DRP-1, di cui NO controlla sia localizzazione che attività GTPasica, regola il differenziamento e riparo muscolare. La seconda serie di evidenze a favore di un ruolo della dinamica mitocondriale nei processi degenerativi

viene dalla evidenza che in molte neuropatie periferiche il danno genetico è costituito da mutazioni in geni che controllano direttamente o indirettamente i processi di fusione e fissione mitocondriale. Tra questi vi sono: la gigaxonina, che bloccando il proteasoma porta ad accumulo di una proteina associata ai microtubuli (MAP 8) che regola il trasporto assonale anche dei mitocondri, le proteine neurofilament light subunit (NFL) e KIF1B, anch'esse coinvolte nel trasporto dei mitocondri, la dinactina, che controlla il reclutamento della proteina di fissione DRP-1 ai mitocondri, GDAP 1 (ganglioside-induced differentiation associated protein 1) che regola la fissione mitocondriale, la mitofusina 2, che regola dinamicamente la fusione mitocondriale in rapporto con FIS-1, OPA e DRP-1.

Lo scopo della ricerca è chiarire i meccanismi molecolari alla base del difetto mitocondriale nelle patologie degenerative neuromuscolari, focalizzandoci sulle distrofinopatie e sulla sclerosi laterale amiotrofica. Attenzione particolare verrà posta al ruolo del NO sia come attore protettivo che pro-rigenerativo con o scopo di identificare quali delle sue azioni sia mediata da un controllo dei processi di fissione e fusione mitocondriale.

Attività previste

Le osservazioni indicate nella descrizione generale del progetto indicano che nel corso delle distrofinopatie, sia in uomo che nei corrispondenti modelli murini, si ha una alterazione della bioenergetica muscolare, con riduzione del potenziale ossidoriduttivo mitocondriale ed alterazioni strutturali nei mitocondri stessi. Osservazioni simili sono riportate in letteratura per alterazioni del sistema nervoso. Abbiamo inoltre evidenza che la funzionalità mitocondriale ed in particolare un corretto processo di fissione e fusione mitocondriale, sono essenziali alla miogenesi in corso di riparo tissutale da danno meccanico o infiammatorio. Sulla base di queste informazioni ci proponiamo di intraprendere le seguenti tre azioni che copriranno il primo anno di attività, estendendosi in parte nel secondo anno:

1. Analisi in vivo di marcatori di attività bioenergetica.

Investigheremo in topi deficienti in alfa sarcoglicano esposti o meno a trattamento con farmaci donatori di NO e confrontati con topi wt: I livelli di ATP, ADP NAD, NADH, piruvato citrato e ossalacetato, misurati attraverso metodi che immuno-enzimatiche e di neuroimaging funzionale.

2. Analisi morfo-funzionale del processo di riparo tissutale in muscoli distrofici.

Si condurranno analisi funzionali in ossigrafia, su fibre isolate con un ossigra-

fo ad alta sensibilità, in topi deficienti in alfa sarcoglicano esposti o meno a trattamento con farmaci donatori di NO e confrontati con topi wt. Si valuteranno in particolare l'attività ossidativa mitocondriale e l'attività dei complessi respiratori mitocondriali. Questi dati saranno paragonati a dati di analisi morfologica con le metodiche della tricromica di Masson ed ematossilina eosina, e di analisi immunoistochimica dei marcatori di riparo muscolare, inclusi i marcatori di staminalità e di proliferazione dei precursori miogenici.

3. *Conseguenze della dinamica mitocondriale nel riparo muscolare.*

Osservazioni preliminari suggeriscono che mitocondri fissi e fusi abbiano proteine diverse al loro interno, e che questi cambiamenti siano legati a stadi specifici del differenziamento muscolare in corso di riparo tissutale. Cercheremo di comprendere la natura di questa diversità molecolare ed il suo significato funzionale, utilizzando anche il topo transgenico per DRP-1. Studieremo inoltre i meccanismi che garantiscano in corso di fissione mitocondriale il mantenimento della corretta funzionalità muscolare, in particolare analizzando il processo della mitofagia.

MECCANISMI MOLECOLARI DI NEURODEGENERAZIONE IN FORME DI SLA AD ESORDIO GIOVANILE (ALS2-ALS4), APOPTOSI, CITOSICITÀ E IPERSENSIBILITÀ AL DANNO OSSIDATIVO: STUDIO DEL RUOLO DELLE PROTEINE SENATAXINA E ALSINA

DR.SSA MARIA TERESA BASSI

E-MAIL: MARIATERESA.BASSI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5
Neurobiologia

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: U.O. RF e U.O. NR1 della sede di Bosisio e tutti i poli dell'IRCCS E. Medea
Ospedale Maggiore Policlinico, Clinica Neurologica, Università di Milano
Polo Ospedale Sacco, Milano (Prof E. Clementi)
Università di Urbino - Istituto di Farmacologia (Prof O. Cantoni)

DESCRIZIONE

Alsina e senataxina sono due proteine coinvolte in due forme di SLA ad insorgenza molto precoce (ALS2) o in età giovanile o giovane-adulta (ALS4). In entrambi i casi si tratta di forme a progressione molto lenta che solitamente non alterano la durata media della vita del soggetto affetto. L'alsina prodotto del gene ALS2, è altresì responsabile di forme complicate di paraparesi spastica ascendente con esordio molto precoce (IAHSP) e sclerosi laterale primaria ad esordio infantile (JPLS), entro i primi 10-18 mesi di vita. La senataxina prodotto del gene SETX oltre ad essere responsabile della forma dominante giovanile di SLA ALS4, è anche coinvolta in altre forme recessive di neurodegenerazione quali atassia e aprassia oculomotoria di tipo 2 (AOA2) e di atassia e neuropatia spesso associate a livelli elevati di alfa-feto proteina. Il progetto è volto a caratterizzare il ruolo di queste proteine in condizione fisiologiche e patologiche in diversi modelli cellulari neuronali e muscolari, in particolare il ruolo nel differenziamento di questi tessuti.

Risultati e prodotti conseguiti

L'attività negli anni precedenti ha portato all'identificazione di interattori della proteina alsina nel tessuto muscolare e a ipotizzare un suo ruolo nel differen-

ziamento muscolare. In particolare si è evidenziato che mentre alsina wild type non varia il pattern di espressione di MyoD o miogenina, fattori chiave della biogenesi e nel differenziamento muscolare, l'alsina G540E diminuisce i livelli di espressione di entrambe suggerendo quindi un ruolo indiretto di alsina sul questo processo. Si sono quindi identificati potenziali interattori di alsina specifici del tessuto muscolare. Per uno di questi interattori, HEYL si è iniziato lo studio del suo ruolo nel differenziamento muscolare. L'espressione di HEYL segue l'espressione di MyoD mentre ha un pattern di espressione opposta a quella di miogenina. Durante il differenziamento l'espressione di HEYL è principalmente nel citoplasma e mostra una colocalizzazione parziale con l'alsina, a ulteriore conferma degli esperimenti di two hybrid. Rimane da definire a livello molecolare qual è la relazione tra queste due proteine e come i loro livelli di espressione possano influenzare il differenziamento muscolare.

Per quanto riguarda la senataxina, i dati ottenuti negli anni precedenti hanno permesso di identificare un suo ruolo nella protezione da danno ossidativo sul DNA cellulari di soggetti controllo e di soggetti con alterazioni di vario tipo (delezioni e missenso) nel gene SETX associate a fenotipo patologico. È stato inoltre identificato un suo ruolo nel processo di dendritogenesi in cellule neuronali primarie di topo (i dati sono descritti in modo dettagliato nella relazione dell'attività del II anno di ricerca). Tale funzione deve essere ulteriormente caratterizzata e confermata in un tipo cellulare diverso e definita a livello molecolare, utilizzando marcatori molecolari già noti associati a pathway di dendritogenesi conosciuti. L'utilizzo di marcatori che definiscono questi pathway noti permetterà di definire se il ruolo di senataxina si inserisce come step aggiuntivo in uno di questi pathway oppure se la senataxina definisce un nuovo processo. La conferma i altri tipi cellulari neuronali permetterà inoltre di stabilire la generalità o al contrario la specificità di questo processo identificando sue eventuali variazioni in presenza di senataxina wt e mutata e in condizioni favorevoli e/o bloccanti il differenziamento neuronale.

Pubblicazioni

Airoldi G, Guidarelli A, Cantoni O, Panzeri C, Vantaggiato C, Bonato S, Grazia D'Angelo M, Falcone S, De Palma C, Tonelli A, Crimella C, Bondioni S, Bresolin N, Clementi E, Bassi MT. Characterization of two novel SETX mutations in AOA2 patients reveals aspects of the pathophysiological role of senataxin. *Neurogenetics*. 2009 Jul 11

Airoldi G, Bondioni S, Guidarelli A, Cantoni O, Panzeri C, Vantaggiato C, Bonato S, D'Angelo MG, Falcone S, De Palma C, Tonelli A, Crimella C, Arnoldi

A, Bresolin N, Clementi E, Bassi MT. Characterization of two novel SETX mutations in AOA2 patients reveals aspects of the pathophysiological role of senataxin. XIII National Congress of the Italian Society for Neurochemistry Milan 2-5 October 2009, p241.

De Palma C, Falcone S, Panzeri C, Radice S, Bassi MT, Clementi E. Endothelial nitric oxide synthase overexpression by neuronal cells in neurodegeneration: a link between inflammation and neuroprotection. *J Neurochem*. 2008;106(1):193-204.

Sztrihai L, Panzeri C, Kálmánchey R, Szabó N, Endreffy E, Túri S, Baschiroto C, Bresolin N, Vekerdy Z, Bassi MT. First case of compound heterozygosity in ALS2 gene in infantile-onset ascending spastic paralysis with bulbar involvement. *Clin Genet*. 2008 ;73(6):591-3.

Attività previste

1. Analisi dei livelli di apoptosi indotta dall'acido retinoico nei cloni transfettati stabilmente con l'shRNA per setx

I livelli di apoptosi indotta dall'acido nei cloni transfettati stabilmente con l'shRNA saranno analizzati determinando l'attività della caspasi 3. A questo scopo useremo un kit della Chemicon. I cloni transfettati stabilmente con il vettore controllo, con setxwt e con l'shRNA verranno piastrati in piastre per colture batteriche in presenza e in assenza di acido retinoico in terreno completo. Dopo 24 e 48 ore gli aggregati verranno pellettati e risospesi in lysis buffer 1x, incubati 10 minuti in ghiaccio e centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C. 70 ul di campione verranno incubati con 10 ul pNA, substrato della caspasi 3, per 2 ore a 37°C in una multiwell da 96. Dopo le 2 ore nella piastra verrà aggiunta una curva di taratura con pNA già marcato e i campioni saranno letti a 405 nm in un lettore di piastre. La caspasi 3 attiva taglia il substrato pNA formando un prodotto marcato che emette a 405 nm. I valori di assorbanza sono perciò direttamente proporzionali alla quantità di caspasi 3 attiva presente nel campione. I valori ottenuti saranno normalizzati sulla concentrazione delle proteine totali presenti nei campioni.

2. Analisi degli attivatori di FGF8

Abbiamo analizzato i livelli di espressione di FGF8 nei cloni stabili durante il differenziamento e abbiamo rilevato che nei cloni transfettati con l'shRNA per setx i livelli di FGF8 sono molto bassi, mentre nei cloni che overesprimono setxwt i livelli di FGF8 sono superiori a quelli dei cloni controllo. I livelli di FGF8 verranno analizzati anche nei cloni indifferenziati per verificare se esiste una

correlazione tra aumento dei livelli di FGF8 e fenotipo differenziato nei cloni wild-type. A questo scopo dai cloni indifferenziati in coltura verrà preparato un pellet cellulare da cui sarà estratto l'RNA. Questo sarà in seguito retrotrascritto a cDNA ed utilizzato per analizzare i livelli di FGF8 tramite Real Time PCR. Inoltre cercheremo di definire se la *senataxina* agisce direttamente a livello del gene per FGF8 o a livello di un suo attivatore a monte. Sappiamo che durante il differenziamento delle P19 i livelli di FGF8 aumentano come conseguenza dell'aggregazione cellulare e dell'innalzamento dei livelli di NCAM. Inoltre, in vivo, durante la formazione del cervello altri geni determinano l'aumento dei livelli di FGF8, come *pax2* e *Lmx1b*. La *senataxina* potrebbe perciò alterare i livelli di espressione di uno di questi geni e di conseguenza avere un effetto sui livelli di FGF8. Analizzeremo quindi i livelli di NCAM, *pax2*, *Lmx1b* nei cloni stabili indifferenziati e durante il differenziamento con e senza acido. Se i livelli di questi geni risulteranno inalterati potremo supporre un effetto diretto della *senataxina* sul gene FGF8.

3. *Analisi del pathway attivato dall'FGF8*

L'aumento dei livelli di FGF8 determina la fosforilazione di vari effettori a valle. La via attivata da FGF8 nelle P19 attiva il differenziamento neuronale e blocca l'apoptosi indotta dall'acido retinoico. Il legame di FGF8 al recettore determina da un lato l'attivazione della via di Ras/MAPK e dall'altra della PI3K/Akt. Akt e ERK1/2 attivano l'espressione di alcuni fattori di trascrizione neurogenici e inibiscono rispettivamente Bad e SMAD1, bloccando la via di morte cellulare attivata dall'acido. Akt inoltre, inibendo GSK3b, favorisce l'espressione e l'attivazione dei geni per la neuritogenesi come MAP1B e TAU. Andremo ad analizzare i livelli di fosforilazione di Akt, GSK3b, ERK, SMAD1 e MAP1B nei cloni stabili durante il differenziamento. A questo scopo determineremo il time course di fosforilazione di queste proteine dopo l'aggiunta di acido retinoico. I cloni stabili verranno perciò fatti differenziare in presenza di acido e ogni 2 ore verranno preparati degli estratti proteici che verranno poi analizzati per SDSPAGE e Western Blot, utilizzando degli anticorpi specifici diretti contro la forma fosforilata e non fosforilata delle proteine. Nei cloni transfettati con l'shRNA ci aspettiamo di rilevare una minore attivazione di ERK ed una conseguente maggiore fosforilazione di SMAD1, questo spiegherebbe la maggiore attività della caspasi 3 e la maggiore apoptosi cellulare rilevate in questi cloni. Al contrario, nei cloni wild-type ci aspettiamo che i livelli di fosforilazione di Akt e GSK3b siano maggiori del controllo. I livelli di fosforilazione di Akt, GSK3b, ERK e SMAD1 verranno analizzati anche nei cloni indifferenziati tramite immunofluorescenza, per verificare se nei cloni wild-type, che presentano un fenotipo differenziato, Akt e GSK3b sono già fosforilate. Le cellule verranno piastrate su vetrini trattati con poliLisina, il

giorno dopo verranno fissate con paraformaldeide e incubate con falloidina per individuare il cono di crescita del neurite e con gli anticorpi diretti contro le forme fosforilate di Akt, GSK3b e MAP1B. Nei cloni wild-type che presentano un fenotipo differenziato la falloidina dovrebbe colorare i coni di crescita e Akt e GSK3b dovrebbero essere fosforilate e localizzate a livello del cono di crescita del neurite.

4. *Analisi dell'effetto dei livelli di FGF8 sulla lunghezza del neurite*

Abbiamo visto che l'overespressione di *setxwt* nei neuroni di ippocampo e nelle P19 determina un aumento della lunghezza del neurite rispetto al controllo, mentre il silenziamento di *setx* ne determina una riduzione di circa il 50%. FGF8 regola la formazione dell'assone tramite l'inibizione della GSK3b e conseguente alterazione dello stato di fosforilazione di MAP1B e Tau e quindi della loro capacità di legare i microtubuli. La correlazione tra livelli di FGF8 e la lunghezza del neurite verrà analizzata nelle cellule P19 in quanto presentano una maggiore efficienza di transfezione rispetto ai neuroni ippocampali. Le cellule P19 verranno fatte differenziare per 4 giorni in presenza di acido retinoico. Il 4° giorno verranno dissociate e piastrate e dopo 5 ore verranno transfettate con il vettore vuoto, con *setxwt* e con l'shRNA. Dopo 72 ore verranno preparati degli estratti di RNA che verranno retrotrascritti a cDNA ed utilizzati per analizzare i livelli di FGF8, *setx*, MAP1B, tubulina beta3 e Ncaderina tramite Real Time PCR. Inoltre tramite immunofluorescenza e SDSPAGE e Western Blot verrà analizzata la fosforilazione di Akt, GSK3b e MAP1B.

5. *Rescue nei neuroni ippocampali e nelle P19*

Per confermare che la variazione della lunghezza dell'assone e l'induzione di morte cellulare dipendono dall'effetto della *senataxina* sui livelli di FGF8, abbiamo deciso di ottenere il rescue del fenotipo descritto nei paragrafi precedenti utilizzando FGF8 ed un inibitore del recettore per FGF8 (FGF8R1), SU5402. Il rescue dell'effetto di *setx* sulla formazione del neurite verrà analizzato in colture primarie di ippocampo. Le cellule di ippocampo verranno transfettate con i vettori ctr, *setxwt* e con l'shRNA in presenza di FGF8 o dell'inibitore. In particolare le cellule transfettate con *setxwt* verranno incubate con l'inibitore SU5402 e le cellule transfettate con l'shRNA verranno incubate con FGF8. Le sostanze saranno aggiunte al terreno al momento della transfezione ed il terreno sarà cambiato ogni giorno. Dopo 72h le cellule verranno fissate con paraformaldeide e incubate con l'anticorpo antiGFP per colorare le cellule transfettate. In seguito saranno fotografate e sarà misurata la lunghezza dei neuriti. Ci aspettiamo che in entrambi i casi la lunghezza del neurite sia pari a quella del controllo non trattato. Nelle P19 sarà invece

effettuato il rescue dell'effetto della senataxina sulla morte cellulare. In questo caso i cloni stabili transfettati con l'shRNA saranno fatti differenziare per 4 giorni con acido retinoico in presenza di FGF8. In questo modo ci aspettiamo che gli aggregati sopravvivano e possano essere dissociati e piastrati.

6. *Analisi dell'attività elicasica*

La presenza di un putativo dominio DNA/RNA elicastico nella porzione C-terminale della proteina e la sua localizzazione nucleare a livello del complesso di splicing, suggeriscono un suo possibile ruolo nella trascrizione nucleare, nel metabolismo dell'RNA (pre mRNA splicing, biogenesi dei ribosomi, RNA decay) e nel trasporto nucleo-citoplasma. La senataxina potrebbe indurre la trascrizione nucleare tramite il legame con un fattore di trascrizione o per interazione diretta con il DNA. Verrà quindi inizialmente analizzata la capacità della senataxina di legare gli acidi nucleici, DNA o RNA, tramite il dominio DNA/RNA elicastico o un altro putativo dominio di binding e verrà definito l'effetto delle mutazioni su questa capacità.

A questo scopo la sequenza della proteina verrà clonata in un vettore pGEX6.1 per la produzione in E.Coli. Il costrutto sarà utilizzato per trasformare E.Coli e la sintesi della proteina sarà indotta aggiungendo l'IPTG alla coltura batterica. I batteri saranno in seguito lisati e l'estratto totale sarà caricato su colonne GST-sefariosio per isolare la proteina di fusione Setx-GST. La proteina sarà purificata tramite taglio proteasico del tag GST e sarà utilizzata nei saggi funzionali. In particolare verrà analizzata la capacità della senataxina di svolgere un'elica di DNA e/o RNA, se la proteina ha attività elicastica 5'@3' o 3'@5' e se il processo avviene tramite idrolisi di ATP o GTP. Per definire l'effetto delle mutazioni sull'attività elicastica, verranno purificate forme di setx contenenti le mutazioni da analizzare.

L'attività elicastica di Setx sarà testata mediante una metodica a fluorescenza che sfrutta le molecular beacons. In breve, un oligonucleotide "molecular beacon" a singolo filamento, che presenta legato ad una estremità un fluorocromo e all'altra un quencher, viene appaiato a un altro oligonucleotide costituito da DNA o RNA: si ha quindi la formazione di una doppia elica in grado di emettere un segnale fluorescente. Se la senataxina presenta attività elicastica, sarà in grado di svolgere questa doppia elica liberando l'oligonucleotide "molecular beacon" che potrà quindi ripiegarsi a formare la tipica struttura a forcina. Di conseguenza, quencher e fluorocromo si troveranno vicini e il segnale fluorescente verrà mascherato. Saranno disegnati oligonucleotidi appropriati per verificare se Setx è una DNA e/o RNA elicasi e se possiede attività 5'@3' o 3'@5' elicastica.

La senataxina potrebbe regolare i livelli di FGF8 legandosi al promotore del gene e inducendone o meno la trascrizione.

STRESS OSSIDATIVO E MICOTOSSINE NELLA SINDROME AUTISTICA

DR.SSA MARIA ELISABETTA RAGGI

E-MAIL: MARIAELISABETTA.RAGGI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Unità Operativa NR2 IRCCS "E. Medea" Polo di Bosisio
ISS di Roma

DESCRIZIONE

Le micotossine, metaboliti secondari prodotti da funghi, sono dei killer silenziosi che colpiscono ovunque. Si possono trovare in tutti gli alimenti e nonostante la loro pericolosità che le pone come rischio reale tra i primi posti nella scala della valutazione (ad esempio prima dei pesticidi) questa non è avvertita dal consumatore. Invece l'attenzione del mondo scientifico nei riguardi di questo problema è notevole. Accanto alle micotossine per le quali sono stati ipotizzati o accertati sospetti di micotossicosi e verso le quali si è concentrata l'attenzione dei ricercatori e degli organismi deputati alla tutela della salute pubblica ve ne sono altre che possiamo considerare emergenti e per le quali può essere accettata l'espressione di "micotossine in cerca di malattia" quali micotossine da *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Tutti i paesi sono interessati ai problemi causati dalle micotossine. Infatti vi sono differenze in termini di scala di importanza ma aflatoxine, fumonisine, ocratossine, tricoteceni e zearalenoni preoccupano tutti i paesi in particolare quelli emergenti. Ormai è accertato che le micotossine agiscono sull'organismo per ingestione, inalazione o per semplice contatto esplicando una serie di effetti. Noi abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul probabile effetto ossidante, neurotossico ed immunologico nella sindrome autistica. Fino all'inizio degli anni ottanta l'incidenza dell'autismo era pari a 3-5 casi ogni 10.000 nascite, con variazioni dipendenti da criteri diagnostici, autori delle ricerche e posizione geografica. Almeno due terzi dei soggetti con autismo manifestava sin dai primi mesi di vita i sintomi iniziali della sindrome. Meno di un terzo invece cominciava

a mostrare regressione nella socialità, nel linguaggio e nel comportamento in un'età compresa tra uno e due anni. Le forme insorgenti come tali erano dunque in leggera prevalenza rispetto a quelle regressive, comunque in un generale andamento epidemiologico costante e non elevato. Nel periodo 1980-85 l'incidenza dell'autismo è raddoppiata. Nel 1985 i casi di cosiddetto autismo regressivo sono risultati di numero uguale a quelli con manifestazioni evidenti sin dai primi mesi di vita dando spazio così all'ipotesi che ci fosse una condizione acquisita al di là degli errori congeniti e delle condizioni puramente genetiche. Dagli anni novanta entrambi i tipi di autismo sono risultati in netto aumento ma questa volta con forte prevalenza percentuale della forma regressiva, divenuta pari a circa il 75% dell'incidenza totale, comunque cresciuta di 10 volte, fino a raggiungere i 30-35 casi su 10.000, con qualche rapporto locale indicante valori addirittura doppi. Ora l'autismo è considerato un disordine multifattoriale con una componente genetica ma parimenti influenzato da fattori ambientali e immunologici e da una aumentata vulnerabilità allo stress ossidativo e con una maggior presenza di intolleranze alimentari.

Risultati e prodotti conseguiti

Al termine del precedente anno di ricerca un'attenta elaborazione dei dati ha mostrato che i risultati ottenuti rappresentano la prima evidenza diretta sulla possibile correlazione tra l'esposizione ad alcune micotossine di origine alimentare e lo sviluppo e la severità di questa grave alterazione dello sviluppo neurocomportamentale del bambino. Questo in quanto sono stati individuati dei sottotipi clinici, in modo da poter correlare eventuali indicatori biochimici, quali le micotossine, con parametri clinici stimati per categorizzazione diagnostica (gruppo1= Q.I. sopra la media; 2= nella norma; 3=borderline; 4=ritardo lieve; 5= ritardo medio; 6=NAS) e dimensione comportamentale. Infatti, i rapporti di Sa/So (marker di esposizione alla fumonisina) nelle urine sono risultati statisticamente diversi tra autistici con stereotipie rispetto ai controlli ($p=0.04$) e tra autistici con livello cognitivo 1-2 (sopra la media-nella norma) e autistici con livello cognitivo 6 (NAS). Mentre la differenza nei rapporti di Sa/So nel siero è risultata significativa tra il campione sperimentale e quello di controllo ($p=0.07$), in particolare si è notata una differenza significativa nel sottogruppo autistici con irritabilità versus controlli.

I livelli di gliotossina nel siero sono sembrati invece significativamente diversi tra i vari gruppi di bambini autistici, soprattutto rispetto al gruppo 6 (NAS) ($p=0.01$, $p=0.001$, $p=0.0004$ e simili) e sembrerebbe anche esistere un trend di correlazione rispetto al grado di livello cognitivo. Se si assume la stadiazione da 1 a 6 come una stadiazione di progressività da uno stadio normale verso uno sempre più grave, si osserva un trend con un indice di

correlazione $r^2=0.43$. Questo numero non è altissimo, ma potrebbe essere significativo considerando la numerosità dei campioni. Soprattutto indicherebbe che esiste una correlazione tra esposizione e gravità: maggiore è la quantità di gliotossina nel siero e maggiore è la gravità dell'autismo a livello cognitivo.

Attività previste

- Sottoporre i bambini alla scala DPC per meglio valutare la dimensione comportamentale
- Terminare i dosaggi delle micotossine
- Terminare il sequenziamento del gene LASS
- Dosare il testosterone serico
- Terminare la ricerca dei miceti nelle feci
- Rielaborare tutti i risultati sin qui ottenuti e quelli che si otterranno sulla base della nuova classificazione comportamentale e correlare i risultati con i diari alimentari.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI SOGGETTI CON DELEZIONE 22Q13 E ALTRE ANOMALIE CROMOSOMICHE MEDIANTE ARRAY-CGH

DR.SSA MARIA CLARA BONAGLIA

E-MAIL: CLARA.BONAGLIA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Laboratorio di Citogenetica, Laboratorio di Biologia Molecolare

Dipartimento di Biologia Generale e Genetica Medica, Università di Pavia
Laboratorio di Citogenetica, Istituto G. Gaslini, Genova; Genetica Medica

DESCRIZIONE

Si definiscono variazioni genomiche strutturali quelle che coinvolgono segmenti di DNA di taglia superiore ad 1 Kb (Feuk et al, 2006). Le variazioni di struttura del genoma umano sono tipicamente suddivise in quelle che risultano da un cambiamento del numero di copie di DNA (delezioni, duplicazioni dirette o invertite) e quelle in cui non vi è perdita o acquisizione di DNA (inversioni e traslocazioni bilanciate). Esse possono originare da differenti meccanismi mutazionali. Questa eterogeneità necessita di un'ulteriore classificazione.

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di approfondire mediante tecniche molecolari la natura dei riarrangiamenti cromosomici ricorrenti e non ricorrenti diagnosticati in soggetti afferenti al nostro Istituto o riferiti da altri centri italiani. Fra i riarrangiamenti cromosomici ricorrenti, intendiamo focalizzarci sulla delezione 22q13, associata ad una sindrome da microdelezione (sindrome da delezione22q13/ PhelanMcDermid) caratterizzata da ritardo mentale, ipotonia, assenza/ritardo del linguaggio e comportamento di tipo autistico. Sebbene sino ad oggi siano stati descritti in letteratura più di 100 casi con delezione 22q13, la frequenza della sindrome non è ancora nota. Tuttavia si ritiene che essa rappresenti la seconda causa di ritardo mentale sindromico dopo la sindrome da delezione 1p36.

La taglia della delezione 22q13 varia da 140 Kb a 9 Mb. Nonostante tutti

gli individui con delezione 22q13 mostrino ritardo mentale e assenza/grave compromissione del linguaggio espressivo, non è ancora definita una precisa correlazione tra la taglia della delezione e il fenotipo della sindrome. Pertanto, il reclutamento di nuovi casi e una dettagliata analisi molecolare porteranno a una migliore definizione della sindrome e della sua incidenza. Intendiamo includere nella casistica di soggetti con delezione 22q13 anche quelli diagnosticati con un cromosoma ad anello [ring(22)]. Nonostante siano noti in letteratura almeno 100 casi con un cromosoma ring(22), rimane ancora oscuro se la variabilità fenotipica possa dipendere dalla taglia del segmento riarrangiato o da una situazione a mosaico derivante dall'instabilità propria dei cromosomi ad anello.

Per approfondire e migliorare, in questi casi, le conoscenze relative alla correlazione genotipo/fenotipo, abbiamo stabilito una collaborazione con l'associazione francese VALENTIN A.P.A.C. Association des Porteurs d'Anomalies Chromosomiques (<http://www.valentin-apac.org>) e l'associazione 22q13 Deletion Support Group Foundation (<http://www.22q13.org>). Queste collaborazioni rappresentano un grossa opportunità di allargare la nostra casistica italiana di pazienti con la sindrome 22q13, che abbiamo studiato in precedenti progetti di ricerca, e migliorare le correlazioni genotipo/fenotipo.

In tutti questi casi, intendiamo definire la taglia del segmento cromosomico riarrangiato e definire l'intervallo dei punti di rottura mediante array-CGH utilizzando una piattaforma ad oligomeri ad alta risoluzione (Agilent, 185k risoluzione ~20Kb). Questo ci consentirà, insieme ad altre tecniche molecolari quali FISH, MLPA e Real-Time PCR, di classificare le anomalie e individuare il meccanismo molecolare che determina il verificarsi della specifica anomalia, sia essa una delezione, inversione, duplicazione, traslocazione e cromosomi ad anello. Questo permetterà come secondo obiettivo di definire una dettagliata correlazione genotipo/fenotipo.

Risultati e prodotti conseguiti

Delezione22q13

Nel primo anno di attività abbiamo analizzato a livello molecolare in 40 pazienti con delezione subtelomeric 22q13, ognuno dei quali risultano nell'aploinsufficienza del gene SHANK3 e mostrano il fenotipo neurologico caratteristico della sindrome da delezione 22q13 (MIM 606232).

I pazienti con delezione 22q13 includono 26 femmine e 14 maschi, con un'età compresa fra 1 anno e 42 anni. L'analisi del fenotipo mostra una considerevole variabilità clinica tra i pazienti, sebbene tutti presentino il fenotipo neurologico caratteristico della sindrome da delezione 22q13 (ritardo dello sviluppo, grave compromissione del linguaggio espressivo, ipotonia neona-

tale). In circa il 40% dei soggetti esibiscono un fenotipo comportamentale nello spettro autistico.

Tutti i soggetti sono stati analizzati mediante array-CGH utilizzando una piattaforma custom 22q13 ad oligonucleotidi (probe spacing: 400 bp; coverage coding and non-coding region) per determinare la taglia e l'estensione della regione genomica e il contenuto in geni delle delezioni. Sono state analizzate 2 categorie di riarrangiamenti: delezioni terminali (N= 35) e delezioni interstiziali (N=4). Le delezioni terminali comprendono le seguenti sottocategorie: delezioni 22q13 a mosaico (N=4) di cui un caso associata a isodisomia paterna e conversione genica (Ref.), traslocazioni sbilanciate (N=4), cromosomi ad anelli 22 (N=5) e delezioni ricorrenti 22q-140Kb (N=5).

L'analisi array-CGH ad alta risoluzione ha individuato le regioni prossimali e distali della delezione permettendo di disegnare primers per amplificare i frammenti di giunzione. Utilizzando questa strategia abbiamo clonato i punti di rottura della delezione in 16 casi.

A parte il breakpoint ricorrente 22q-140 Kb, i risultati ottenuti mostrano che la maggior parte dei punti di rottura 22q13 sono unici e sparsi lungo un intervallo 8.9 Mb .

L'analisi della sequenza dei punti di rottura rivela una significativa incidenza di elementi ripetitivi come simple tandem repeats (STRs); short interspersed nuclear elements (SINE), che includono sequenze Alu; long interspersed nuclear elements (LINE).

Tra i casi con delezione 22q13 abbiamo dimostrato che in un caso la delezione 22q13 era il risultato di un mosaicismo complesso prodotto da un evento di ricombinazione post-zigotica che ha determinato la formazione di una linea cellulare con un cromosoma 22 materno deletato e una linea cellulare apparentemente normale costituita da isodisomia paterna e conversione genica.

Pubblicazioni

Maria Clara Bonaglia, Roberto Giorda, Roberto Ciccone, Orsetta Zuffardi. Chromosome 22q13 rearrangements causing global developmental delay and autistic spectrum disorder. Monograph Human Genetics 18(Chapter 12):137-150

Bonaglia MC, Giorda R, Beri S, Bigoni S, Sensi A, Baroncini A, Capucci A, De Agostini C, Gwilliam R, Deloukas P, Dunham I, Zuffardi O. Mosaic 22q13 deletions: evidence for concurrent mosaic segmental isodisomy and gene conversion. Eur J Hum Genet. 2009 Apr;17(4):426-33. Epub 2008 Oct 15. PubMed PMID: 18854866; PubMed Central PMCID: PMC2682770.

Duplicazione Xp11.2

Abbiamo studiato 9 casi con duplicazione Xp11.2 in maschi e femmine mediante array-CGH che presentavano ritardo mentale, ritardo del linguaggio e un EEG peculiare. La taglia della duplicazione variava da 0.8 Mb a 9.2 Mb. Molte delle femmine affette mostravano una inattivazione preferenziale della X duplicata. Le portatrici della duplicazione mostravano una ereditarietà X-linked recessiva. Tutti gli individui affetti mostravano un'espressione dominante e comparabile al fenotipo clinico dei corrispettivi sesso, taglia della duplicazione e pattern di inattivazione. I nostri dati suggeriscono che la duplicazione Xp11.22-11.23 costituisce una nuova sindrome.

Pubblicazione

Giorda R, Bonaglia MC, Beri S, Fichera M, Novara F, Magini P, Urquhart J, Sharkey FH, Zucca C, Grasso R, Marelli S, Castiglia L, Di Benedetto D, Musumeci SA, Vitello GA, Failla P, Reitano S, Avola E, Bisulli F, Tinuper P, Mastangelo M, Fiocchi I, Spaccini L, Torniero C, Fontana E, Lynch SA, Clayton-Smith J, Black G, Jonveaux P, Leheup B, Seri M, Romano C, dalla Bernardina B, Zuffardi O. Complex segmental duplications mediate a recurrent dup(X)(p11.22-p11.23) associated with mental retardation, speech delay, and EEG anomalies in males and females. Am J Hum Genet. 2009 Sep;85(3):394-400. Epub 2009 Aug 27. PubMed PMID: 19716111

Delezione 19p13.12

Abbiamo analizzato 3 pazienti con differenti età (6 mesi, 7 e 31 anni) con delezioni criptiche che coprono la regione 19p13.12. Tutti i soggetti mostrano un fenotipo comune con quello di un paziente di 10 anni recentemente riportato in letteratura: ritardo mentale, ritardo psicomotorio e del linguaggio, sordità, brachicefalia, narici anteverse, filtro lungo e malformazioni delle orecchie. La regione comune di delezione contiene 6 geni (LPHN1, DDX39, CD97, PKN1, PTGER1, and GIPC1), molti dei quali possono essere geni candidati per il ritardo mentale in base alle loro funzione ed espressione.

LPHN1 e PKN1 sono i più interessanti. LPHN1 per la sua interazione con la famiglia delle proteine shank; PKN1 poiché coinvolto una serie di funzioni nei neuroni, incluso l'organizzazione del citoscheletro. L'aploinsufficienza di GPC1 può contribuire alla sordità per la sua interazione con la miosina VI. Nei due pazienti più vecchi è stato osservato un fenotipo comportamentale caratterizzato da overattività associata a ritardo mentale e stereotipe (ICD10) in un caso e iperattività nell'altro. Poiché il topo knock-out Ptger mostra un'inibizione del comportamento e aggressività con difetti nell'interazione sociale,

l'aploinsufficienza del gene PTGER può essere responsabile per questi tratti comportamentali osservati in questi due pazienti.

Pubblicazioni

Maria Clara Bonaglia, Susan Marelli, Francesca Novara, Simona Commodaro, Renato Borgatti, Grazia Minardo, Luigi Memè, Elisabeth Mangold, Silvana Beri, Claudio Zucca, Daniele Brambilla, Massimo Molteni, Roberto Giorda, Ruthild G. Weber, Orsetta Zuffardi. Genotype-phenotype relationship in three cases with overlapping 19p13.12 microdeletions. Submitted to EJHG

Traslocazioni Sbilanciate de novo

Abbiamo analizzato mediante array-CGH 8 traslocazioni sbilanciate de novo (Tsdn).

In due casi è stato dimostrato che il derivativo non era deleto come atteso ma conteneva una porzione distale deleta associata a una duplicazione invertita contigua su cui era trasposto il secondo cromosoma coinvolto nella traslocazione (invdupdel). Questi dati suggeriscono che il cromosoma derivativo fosse originariamente un cromosoma dicentrico, originatosi alle meiosi, con rottura asimmetrica e successiva stabilizzazione postzigotica attraverso "telomere capture". Quest'ultimo cromosoma può avere la stessa origine parentale dell' invdupdel oppure derivare dall'altro genitore, dimostrando così l'origine post-zigotica di Tsdn.

In altri due casi abbiamo dimostrato che i due cromosomi, coinvolti nella traslocazione, hanno diversa origine parentale. Sembra verosimile che queste due ultime traslocazioni siano comunque derivate da un cromosoma dicentrico originatosi alla meiosi e che il derivativo sia il reciproco dell' invdupdel. La probabilità che l'evento del "telomere capture" accada a livello di due cromosomi della stessa origine parentale anziché di due cromosomi di origine parentale diversa è del 50%. Quindi, è verosimile che altre traslocazioni sbilanciate de novo si originino con questo meccanismo e che l'evento di traslocazione sia postzigotico.

A conferma della nostra ipotesi, recenti pubblicazioni dimostrano che anche alcuni cromosomi ad anello si originano da un cromosoma dicentrico.

È in corso la stesura del lavoro scientifico

Altre pubblicazioni sui riarrangiamenti cromosomici

Zuffardi O, Bonaglia M, Ciccone R, Giorda R. Inverted duplications deletions: underdiagnosed rearrangements? Clin Genet. 2009 Jun;75(6):505-13. Review. PubMed PMID: 19508415.

Attività previste

Reclutamento dei pazienti con riarrangiamenti cromosomici

I pazienti con riarrangiamenti cromosomi che verranno inclusi in questo studio saranno quelli diagnosticati presso il nostro Istituto e quelli riferiti da altri centri italiani.

Reclutamento dei pazienti con delezione 22q13

Intendiamo reclutare almeno 20 pazienti francesi con la delezione 22q13 in due anni mediante collaborazione con le associazioni 22q13 Deletion Support Group Foundation (<http://www.22q13.org>) and VALENTIN A.P.A.C. Association de Porteurs d'Anomalies Chromosomiques (<http://www.valentin-apac.org>). Il fenotipo dei pazienti sarà raccolto mediante un questionario in collaborazione con medici e genitori associati ad entrambe le Associazioni. Includeremo in questo studio i dati collezionati dal precedente studio sui soggetti italiani per un totale di almeno 40 pazienti.

Caratterizzazione molecolare delle anomalie cromosomiche

In prima battuta verrà eseguita l'analisi del cariotipo molecolare (Array-CGH) sul DNA del probando e se necessario su quello dei genitori. Quest'analisi consentirà di stabilire la taglia del segmento genomico riarrangiato, rilevare e/o escludere la presenza di altri sbilanci genomici criptici, definire l'intervallo del punto di rottura.

L'analisi mediante FISH consentirà di stabilire la natura di specifici riarrangiamenti cromosomici (es. duplicazioni dirette e/o invertite) e/o di confermare specifici sbilanci genomici. L'origine parentale dei riarrangiamenti sarà definita mediante l'analisi con marcatori polimorfici. In seguito, i punti di rottura verranno definiti mediante long-range PCR o generando cloni ibridi uomo-hamster, e sequenziati. Sequenze ripetute potenzialmente instabili coinvolte nei riarrangiamenti verranno studiate per verificarne la capacità di causare rotture cromosomiche meiotiche e in cellule di mammifero.

I geni coinvolti nei riarrangiamenti verranno analizzati mediante RT-PCR e analisi quantitativa di espressione (qRT-PCR). I geni la cui espressione risulterà significativamente diversa nel soggetto affetto rispetto ai campioni di controllo potrebbero essere coinvolti nella patologia.

Correlazione genotipo/fenotipo

I dati clinici e molecolari collezionati sia dagli individui Francesi che parteciperanno allo studio con delezione 22q3, sia da quelli con altre anomalie cromosomiche saranno confrontati con i dati riportati in letteratura.

MALATTIA DEL MOTONEURONE: STUDIO FUNZIONALE IN DROSOPHILA DEL GENE SENATAXINA, RESPONSABILE DI FORME PRECOCI DI MND

DR.SSA GENNY ORSO

E-MAIL: GENNY.ORSO@UNIPD.IT

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Laboratorio di biologia molecolare IRCCS "E. Medea" Polo di Bosisio

DESCRIZIONE

Le neuro(no)patie motorie distali (dHMN) anche conosciute come CMT spinali o SMA distali, sono malattie eterogenee dal punto di vista clinico e genetico, caratterizzate da atrofia muscolare peroneale ed assenza di sintomi sensoriali. Il quadro clinico generale consiste in una progressiva debolezza e atrofia dei muscoli estensori dei piedi e delle dita dei piedi, spesso associata a sintomi secondari che coinvolgono anche i muscoli distali degli arti inferiori. Questo tipo di patologie sono state classificate in base all'età di insorgenza, modalità di trasmissione, e presenza di caratteristiche aggiuntive in quattro sottogruppi autosomici dominanti, tre sottotipi recessivi infine in altre tre nuove variante clinico-genetiche quali dHMN con segni piramidali, SMA distale congenita e una forma recessiva (dHMN Jerash). Le forme di malattia del motoneurone associate a difetti del gene *senataxin*, oggetto di questo studio, appartengono alle neuropatie motorie distali con segni piramidali caratterizzate da un esordio precoce (prima dei sei anni), lenta e progressiva debolezza e atrofia ad inizio distale degli arti inferiori. Dal punto di vista clinico, tali pazienti presentano associazione tra segni tipici di secondo motoneurone (atrofia e paresi) e segni piramidali (riflessi vivaci e segni di Babinski), testimoni di un coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Benché la sua funzione rimanga ignota, la proteina *senataxin* contiene un dominio DNA/RNA elicasi con forte omologia con la proteina IGHMBP2 nella dHMN del quarto gruppo, che suggerisce un possibile ruolo nella biogenesi o regolazione dei processi a carico dell'mRNA. Inoltre recenti pubblicazioni

scientifiche hanno dimostrato come *senataxin* sia coinvolta nella riparazione del DNA e in varie fasi nella regolazione della trascrizione dell'RNA, anche se rimangono molte questioni aperte in riferimento al pathway molecolare, funzione biologica e interattori. Di conseguenza la comprensione del meccanismo patogenetico della malattia è al momento molto lacunosa, e conseguentemente appare estremamente difficile ipotizzare qualsiasi efficace strategia di trattamento.

Date queste premesse il sistema modello come *Drosophila melanogaster*, che intendiamo utilizzare in questo studio, costituisce un valido aiuto per chiarire molti degli aspetti oscuri riguardanti queste malattie neurodegenerative.

Il database di *Drosophila* "Homofilla", utilizzando informazioni delle sequenze di geni umani coinvolti in malattie genetiche presenti nei database NCBI ONIM (Online Mendelian Inheritance in Man) e comparandole con quelle presenti nei database di *Drosophila* (Flybase), riporta il gene *cg7504* come il candidato principale in *Drosophila* del gene umano *senataxin*. Inoltre la sequenza aminoacidica del gene *cg7504* presenta, come nel caso della proteina umana, un dominio FHA (forkhead-associated domain) presente in molte proteine di tipo regolatorio come chinasi, fosfatasi, kinesine, fattori di trascrizione, proteine che legano l'RNA ed enzimi metabolici che sono coinvolti in diversi processi: riparazione del DNA, trasduzione del segnale, trasporto vescicolare e degradazione proteica. L'omologia di questo gene sembra infatti mantenersi non solo nella sequenza aminoacidica ma anche nella possibile funzione biologica, essendo molto probabile il suo coinvolgimento nei processi di biosintesi e replicazione di DNA e nel metabolismo del tRNA.

Drosophila permette di studiare geni malattia con un approccio chiamato "reverse genetic" e che prevede la generazione di alleli gain of function, loss of function e l'espressione ectopica controllata spazio-temporalmente sia della proteina umana che di *Drosophila* utilizzando una serie di tecniche biochimiche, molecolari e genetiche in un contesto organotipico in cui i principali pathways biologici vengono conservati a livello cellulare e molecolare.

Risultati e prodotti conseguiti

Lo sviluppo del modello di *Drosophila* per il gene *cg7504*, omologo al gene umano *senataxin*, prevedeva nel corso del primo anno di lavoro di affrontare i seguenti aspetti sperimentali:

1. Identificazione del gene di *Drosophila* omologo al gene umano *senataxin*, coinvolto in una forma giovanile di Sclerosi Amiotrofica Laterale.
2. Analisi della sequenza aminoacidica per definire domini funzionali della proteina e identificare possibili aminoacidi da utilizzare per la mutagenesi mi-

rata e generare sia mutazioni funzionali che riprodurre mutazioni patologiche.

3. Estrazione di RNA da *Drosophila* e conseguente retro trascrizione e clonaggio del cDNA del gene di interesse e sequenziamento per valutare la presenza di mutazioni

4. Clonaggio di costrutti per il knockdown mediato da RNAi
5. Ricerca di possibili p-element negli stock center di *Drosophila* da utilizzare come potenziali mutanti del gene *senataxina* e loro analisi molecolare.
6. Sviluppo di anticorpi contro la *senataxina* di *Drosophila*

Tutti gli obiettivi sopra indicati sono stati rispettati con l'eccezione della generazione del costrutto contenente il cDNA di *senataxina* per la presenza di mutazioni all'interno della sequenza clonata. Il cDNA è ancora in fase di clonaggio.

Per quanto concerne l'analisi della sequenza proteica abbiamo confermato la presenza dei domini e motivi principali contenuti anche nella proteina umana quali: FHA domain, DNA/RNA helicase domain e svariati motivi di localizzazione nucleare disseminati lungo tutta la sequenza proteica. Sono stati anche identificati gli aminoacidi conservati per generare mutazioni patologiche all'interno della proteina.

I costrutti per il knockdown sono stati generati e inviati alla ditta di riferimento per la generazione di animali transgenici. Gli anticorpi contro *senataxina* di *Drosophila* sono stati disegnati nella parte N-terminale e C-terminale della proteina (epitopi: 1-DDARKRKVYFNLDRDDVND 2 KQKGRRSKSKSPNDH) e saranno testati.

Sono state identificate due linee potenzialmente utili per generare mutanti di *senataxina* a sono state analizzate dal punto di vista molecolare. La linea w1118; Mi{ET1}CG7504MB04533 comporta l'inserimento del p-element nel penultimo esone del gene e causa un trascritto parziale di *senataxina*: la sequenza genomica e l'analisi del cDNA di questi animali suggeriscono che il dominio DNA/RNA elicase presente nella parte C-terminale della proteina sia mancante.

Attività previste

In questa seconda fase del progetto gli obiettivi sperimentali proposti sono i seguenti:

1. Analisi della linea mutante w1118; Mi{ET1}CG7504MB04533: saranno effettuati su questa linea mutante analisi sulla plasticità sinaptica (morfologia, fisiologia, espressione di marcatori neuronali), su difetti di locomozione e verranno testati alcuni anticorpo che fanno parte delle vie di riparazione del DNA. Per generare ulteriori mutanti saranno utilizzate delle linee di trasposasi specifiche che permetteranno l'escissione dal genoma del p-element e con-

seguinte generazione di piccole delezioni o mutazioni nelle zone adiacenti al suo inserimento. Questo permetterà di ottenere mutanti diversi da quello iniziale.

2. I mutanti generati nel primo punto saranno poi analizzati dal punto di vista della letalità, di fenotipi neuronali e muscolari, per difetti di locomozione e fenotipi visibili a carico di altri tessuti.

3. Saranno generate mutazioni patologiche a carico della proteina: le mutazioni sono state scelte in modo da interessare diversi domini funzionali di *senataxina*.

4. Gli anticorpi generati contro *senataxina* saranno testati su tessuti di *Drosophila* per le caratterizzazione dell'espressione endogena della proteina, su alleli mutanti per definire l'efficienza di knockdown della stessa, su eventuali linee transgeniche per la sovra espressione della proteina wild type.

5. Eventuali fenotipi dovuti ad alleli o transgeni loss e gain of function saranno utilizzati per l'analisi delle vie di riparazione del DNA. Verrà utilizzato un reporter specifico generato in *Drosophila* (rp3) per la caratterizzazione di difetti nelle varie vie della riparazione del DNA.

SVILUPPO DI UN MODELLO DI MALATTIA DI CHARCOT-MARIE-TOOTH IN DROSOPHILA**DR. ANDREA DAGA**

E-MAIL: DAGA@UNIPD.IT

Linea di Ricerca n. 5
Neurobiologia*Periodo di svolgimento*
2010*Tipo di ricerca*
Corrente*Polo scientifico*
Conegliano e Pieve di Soligo**DESCRIZIONE**

Charcot-Marie-Tooth (CMT) è un gruppo di patologie caratterizzato dalla degenerazione dei più lunghi nervi motori e sensoriali che innervano le mani e i piedi. Le forme più comuni di CMT dipendono da difetti funzionali delle cellule di Schwann che provocano demielinizzazione dei nervi periferici. Mutazioni nel gene che codifica per la proteina mitofusina 2 sono invece responsabili dell'insorgenza del Charcot-Marie-Tooth disease di tipo 2A (CMT2A), caratterizzato da degenerazione assonale. La mitofusina 2 è una proteina transmembrana localizzata nella membrana mitocondriale esterna e caratterizzata dalla presenza di un dominio GTPasico N-terminale. La mitofusina 2 svolge la sua principale funzione nel processo di fusione mitocondriale che controlla le dinamiche mitocondriali nelle cellule. CMT2A è una patologia autosomica dominante e la maggioranza delle mutazioni identificate cadono all'interno o vicino al dominio GTPasico della proteina. Poiché queste mutazioni non sono state caratterizzate dal punto di vista funzionale non si sa come esse influenzino le dinamiche mitocondriali e conseguentemente la funzione neuronale. A causa della dominanza e della necessità di un'intatta attività GTPasica per la funzione della mitofusina, è stato suggerito che CMT2A sia dovuto ad aploinsufficienza della mitofusina 2. Una possibilità alternativa è che mutazioni CMT2A rappresentino alleli dominanti della mitofusina 2 che interferiscono con la normale funzione della mitofusina 2 espressa dall'allele wild-type. Variazioni di morfologia, movimento o distribuzione dei mitocondri causate da queste mutazioni potrebbero impedire il reclutamento dei mitocondri ai terminali sinaptici.

Poiché a tutt'oggi non esistono modelli animali di CMT2A, il progetto proposto prevede la generazione di un modello di CMT2A in *Drosophila*. In associazione a questo, analizzeremo anche le conseguenze della perdita di Marf sul movimento assonale dei mitocondri e come la perdita di funzione della

mitofusina in *Drosophila* modifichi la distribuzione dei mitocondri nel terminale sinaptico della giunzione neuromuscolare, una sinapsi modello che si presta efficacemente a questo tipo di indagini sperimentali. Nel loro complesso queste indagini ci consentiranno di determinare quale sia il meccanismo patogenetico alla base di CMT2A.

Per realizzare questo progetto sono già stati generati importanti e interessanti dati preliminari. Innanzitutto sono state condotte "blast searches" di database di *Drosophila* usando la sequenza della proteina mitofusina 2 umana che hanno rivelato che il genoma del moscerino possiede due prodotti genici ad essa omologhi, il già noto fuzzy onions (fzo) ed una proteina non ancora studiata chiamata Marf, che presenta elevata omologia con la mitofusina 2 e che a buon diritto può esserne considerata l'unico omologo presente nel genoma di *Drosophila*. Sulla base dell'elevato grado di omologia di Marf con la mitofusina 2 umana, ipotizziamo che un simile grado di conservazione sia mantenuto anche a livello funzionale. Per questo motivo sfruttando tecniche di RNA interference in vivo abbiamo analizzato le conseguenze dell'eliminazione di Marf nella giunzione neuromuscolare della larva di *Drosophila*. I risultati di questo esperimento hanno dimostrato che il knockdown di Marf specificamente nel sistema nervoso della *Drosophila* produce evidenti alterazioni morfologiche della sinapsi neuromuscolare. Poiché è noto che alterazioni nel numero o nella distribuzione dei mitocondri nella sinapsi neuromuscolare ne causa difetti morfologici, questa osservazione indica che molto probabilmente le alterazioni della sinapsi neuromuscolare causate dall'assenza di Marf sono dovute a difetti "mitocondriali".

Attività previste

Sulla base delle premesse sopra esposte, gli obiettivi di questo progetto sono:

*1. La generazione un modello di CMT2A in *Drosophila**

(1a) Dovremo inizialmente stabilire che Marf corrisponde funzionalmente alla mitofusina 2. A questo scopo genereremo anticorpi specifici per determinare se Marf come la mitofusina 2 localizzi a livello subcellulare nei mitocondri.

(1b) Successivamente stabiliremo se Marf ha un ruolo nella fusione dei mitocondri analizzando la morfologia mitocondriale in condizioni di RNA interference ossia di assenza di Marf. La perdita della mitofusina 2 risulta in frammentazione mitocondriale e ci aspettiamo che la mancanza di Marf dia luogo a un fenotipo analogo.

(1c) Dopo aver stabilito la corrispondenza funzionale tra mitofusina 2 e Marf, stabiliremo se l'introduzione di mitofusina 2 transgenica è in grado di com-

pensare l'assenza di Marf (rescue) in *Drosophila* knockdown.

(1d) Poiché sulla base dei risultati preliminari abbiamo ragione di credere che la mitofusina 2 possa efficacemente sostituire funzionalmente Marf, genereremo mutanti loss of function di Marf utilizzando una recente tecnica che consente di creare knock-outs in *Drosophila*.

(1e) Una volta ottenuta una linea Marf knockout, potremo introdurre per via transgenica sia mitofusina 2 wild-type sia mitofusina 2 contenente mutazioni patologiche per generare il modello animale di CMT2A. La disponibilità di questo modello consentirà di condurre una serie di analisi sperimentali volte a stabilire il meccanismo patogenetico responsabile di CMT2A.

2. Analisi della distribuzione dei mitocondri nel terminale sinaptico della giunzione neuromuscolare e del movimento assonale dei mitocondri a seguito di assenza di Marf

(2a) Saranno quantificati i parametri morfologici (area sinaptica, numero di bottoni sinaptici, dimensione dei bottoni) delle giunzioni neuromuscolari di moscerini knockdown per Marf e paragonati a quelli di moscerini di controllo per determinare il tipo di difetto morfologico prodotto dall'assenza di Marf.

(2b) I mitocondri saranno visualizzati usando un marcatore specifico e sarà determinato il numero e la distribuzione a livello della sinapsi neuromuscolare. Utilizzando metodologie di imaging confocale su larve di *Drosophila* in vivo, valuteremo la velocità e la direzionalità del trasporto assonale dei mitocondri ed il numero di mitocondri mobili ed immobili sia in condizioni normali sia dopo RNA interference di Marf. Analisi simili saranno infine condotte anche in *Drosophila* che esprimono combinazioni patologiche di mitofusina 2 umana mutata e wild type al fine di stabilire se il movimento assonale e la distribuzione sinaptica dei mitocondri possano essere collegati all'insorgenza di CMT2A.

Materiali e metodi

Obiettivo 1

(1a) Per generare un anticorpo specifico contro Marf la proteina sarà espressa in batteri come fusione con la GST e sarà poi utilizzata per la produzione di anticorpi policlonali in coniglio. La proteina Marf endogena sarà localizzata a livello subcellulare in embrioni e larve di *Drosophila* con tecniche di immunofluorescenza e microscopia confocale utilizzando marcatori dei mitocondri come mito-GFP e mitotracker.

(1b) I mitocondri saranno visualizzati esprimendo in *Drosophila* il transgene UAS-mito-GFP con l'ausilio del sistema di espressione Gal4/UAS. Simultaneamente sarà anche espresso il costrutto per RNA interference UAS-Marf-

RNAi e la morfologia dei mitocondri sarà valutata grazie a microscopia confocale in vari tessuti larvali ed embrionali.

(1c) Per valutare la rescue da parte della mitofusina 2 della mancanza di Marf dovremo generare linee transgeniche per l'espressione di mitofusina 2. Il cDNA della mitofusina 2 sarà clonato nel vettore di trasformazione pUAST e poi microiniettato in embrioni di *Drosophila* per creare linee transgeniche stabili UAS-mitofusina2. Utilizzando incroci genetici creeremo moscerini che esprimono contemporaneamente UAS-Marf-RNAi e UAS-mitofusina2 e saremo così in grado di valutare se la presenza di mitofusina 2 esogena induce "rescue" dei fenotipi prodotti dall'assenza di Marf.

(1d) Per la generazione di mutanti Marf loss of function useremo il metodo del gene targeting mediante ricombinazione omologa. Il primo passo per ottenere ricombinazione omologa in *Drosophila* è la generazione di individui transgenici. Questi individui portano un transgene costruito in vitro nel quale il gene codificante Marf è sostituito da un gene marcatore che a sua volta è fiancheggiato dalle sequenze genomiche che si trovano normalmente ai lati di Marf e che consentono la ricombinazione omologa. I transgenici contenenti il costrutto per il targeting di Marf saranno sottoposti ad una serie di incroci genetici il cui risultato finale è la sostituzione del gene Marf endogeno con il gene marcatore.

(1e) Utilizzando tecniche di mutagenesi sito-specifica saranno specificamente introdotte nei cDNA della mitofusina 2 le più frequenti mutazioni identificate nei pazienti con CMT2A. Le varie versioni mutate del cDNA della mitofusina 2 saranno subclonate in vettori di trasformazione e microiniettate in embrioni di *Drosophila* per creare linee transgeniche stabili UAS-mitofusina2 mutata. Sfruttando incroci genetici adeguati costruiremo linee stabili di *Drosophila* che esprimono una copia normale ed una copia mutata di mitofusina 2 nel background genetico nullo per Marf e quindi simulano la condizione genetica dei pazienti CMT2A. In questo modello condurremo varie analisi di morfologia mitocondriale, sulla distribuzione dei mitocondri lungo gli assoni e nella sinapsi neuromuscolare e valuteremo la mobilità assonale dei mitocondri per meglio comprendere la patofisiologia di CMT2A.

Obiettivo 2

(2a) Le giunzioni neuromuscolari saranno visualizzate in preparazioni di larva di *Drosophila* grazie all'uso di anticorpi che riconoscono sia proteine pre- sia post-sinaptiche e le immagini acquisite per mezzo di microscopia confocale. L'uso di un software specifico (Velocity, Improvion) e di analisi statistiche permetterà di quantificare con precisione vari parametri morfologici quali area sinaptica, numero di bottoni, grandezza dei bottoni, numero di ramificazioni.

(2b) La valutazione del trasporto assonale dei mitocondri sarà condotta in vivo, su larve non fissate. Saranno esaminate larve che esprimono solo il marker mitocondriale mito-GFP e larve che simultaneamente esprimono anche il costrutto per RNA interference. Per analizzare i dati sul trasporto dei mitocondri si esegue il “bleaching” di una piccola porzione di assone motore in modo tale che il segnale mito-GFP scompare. L’acquisizione di immagini confocali sulla stessa area ogni 2 secondi per un periodo di 5 minuti consente di seguire i mitocondri marcati con GFP che dalle aree circostanti si muovono nella zona “bleached”. Un software dedicato permette di analizzare queste sequenze di immagini e determinare vari parametri di movimento. Questa analisi rivelerà se vi siano difetti nel trasporto dei mitocondri associati all’assenza di Marf.

Quando i moscerini che riproducono la patologia CMT2A saranno disponibili, simili analisi di morfologia e trasporto mitocondriale saranno estese a questo potenziale modello di malattia.

Modalità e tempi di esecuzione

Il completamento degli obiettivi 1° e 1b richiederà circa 6 mesi, l’obiettivo 1c sarà portato a termine entro il primo anno di finanziamento, l’obiettivo 1d dovrebbe essere completato in 15-18 mesi e il completamento dell’obiettivo 1e richiederà tutti i 24 mesi coperti dal finanziamento richiesto. L’obiettivo 2 verrà portato avanti simultaneamente all’obiettivo 1. Verosimilmente l’obiettivo 2a sarà portato a termine entro i primi 6 mesi, ma il suo completamento richiederà i 24 mesi.

RUOLO DEL GENE BRIP1 (FANCIJ) NELLA DESTABILIZZAZIONE DELLE SEQUENZE CON CONFORMAZIONE G-QUADRUPLIX ASSOCIATE A RIARRANGIAMENTI COSTITUZIONALI DEL GENOMA UMANO

DR. ROBERTO GIORDA

E-MAIL: ROBERTO.GIORDA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 5
Neurobiologia

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

DESCRIZIONE

Sequenze di DNA contenenti serie di guanine adiacenti (G-tracts) si ripiegano spontaneamente in strutture a quattro catene chiamate G-quadruplex. Il genoma umano è ricco di queste strutture, sia in regioni contenenti sequenze ripetute (particolarmente i telomeri) che in regioni associate a domini genomici funzionali, particolarmente le regioni promotoriali. I G-quadruplex hanno la tendenza a formare, anche in vivo, strutture particolarmente stabili, che probabilmente potrebbero rappresentare una barriera alla replicazione del DNA e quindi essere una fonte potenziale di instabilità genetica, se queste strutture non vengono risolte. La scoperta che le elicasi RecQ svolgono ruoli importanti nel mantenimento dei telomeri e nella regolazione sia della replicazione che della ricombinazione omologa ha fornito indizi sull’identità dei loro DNA substrati. La famiglia delle elicasi RecQ è altamente conservata da E. coli all’uomo e catalizza la separazione di coppie di basi usando ATP come fonte di energia. Nell’uomo esistono almeno cinque elicasi RecQ e la loro funzione è emersa da studi di sindromi da instabilità genomica causate da mutazioni loss-of-function in una delle elicasi. Per esempio, mutazioni nel gene WRN causano la sindrome di Werner, caratterizzata da invecchiamento prematuro ed elevato rischio di cancro, mentre mutazioni nella elicasi BLM causano la sindrome di Blooms, caratterizzata da aumentata predisposizione al cancro. Alcune RecQ elicasi hanno un ruolo generale nel mantenimento dell’integrità genomica, mentre altre sembrano funzionare preferenzialmente ai telomeri. Cellule di pazienti con la sindrome di Werner mostrano senescenza prematura e tassi accelerati di accorciamento dei telomero. La WRN elicasi è necessaria per prevenire una drammatica perdita di telomero durante la replicazione del “lagging strand” sulla catena ricca di G e la conseguente

accumulazione di aberrazioni cromosomiche, come le fusioni di cromosomi. Le elicasi umane WRN e BLM hanno una potente attività di unwinding dei quadruplex in vitro e contengono un dominio conservato che lega i G-quadruplex ad alta affinità, dando sostegno all'idea che queste DNA elicasi agiscano assicurando il mantenimento dell'integrità cromosomica mediante la risoluzione dei G-quadruplex. Tuttavia la loro specificità di substrato non è esclusiva per i G-quadruplex e studi recenti indicano che le elicasi umane WRN e RTEL hanno anche un ruolo nel processamento o nella soppressione delle strutture D-loop durante la ricombinazione omologa. Il gene BRIP1 è un membro della famiglia DEAH di DNA elicasi. Mutazioni di BRIP1, altresì denominato FANCI, sono associate a una forma recessiva (gruppo di associazione J) di anemia di Fanconi (FA) e ad aumentata suscettibilità a tumori dell'ovaio e della mammella. L'omologo in *C. elegans*, DOG-1, è cruciale per la stabilità dei G-tracts nel genoma. Vermi con delezioni in DOG-1 accumulano delezioni in regioni del genoma che contengono lunghi G-tracts. Inoltre, l'introduzione in *C. elegans* di una sequenza di DNA che forma quadruplex in vitro è altamente mutagenica, e questa sequenza viene deleta in genomi che non hanno il gene DOG-1 (*dog-1*).

Linee cellulari da pazienti con mutazioni di BRIP1 accumulano grosse delezioni associate a elementi G-tetraplex. Si può ipotizzare che anche FANCI, come DOG-1, abbia la funzione di risolvere potenziali impedimenti alla replicazione causati da G-quadruplex di DNA.

Delezioni ricorrenti terminali de novo della porzione terminale del cromosoma 22, riparate mediante "telomere healing", sono state osservate in vari soggetti con sindrome da delezione 22q13. Una sequenza ripetuta diretta con un elevato potenziale di formare una struttura G-quadruplex è localizzata a livello del punto di rottura di queste delezioni ricorrenti. Abbiamo dimostrato la potenzialità di questa regione di formare double-strand breaks (DSBs) in lievito, analogamente a quanto accade con sequenze palindromiche e triplette CAG ripetute. Abbiamo inoltre analizzato l'incidenza di delezioni riparate dall'aggiunta di sequenze telomeriche in DNA estratto da sangue e cellule germinali maschili di soggetti normali, trovando una elevata frequenza di delezioni nel DNA di spermatozoi, a un livello comparabile a quello delle traslocazioni ricorrenti 11;22 e delle delezioni dell'alfa-globina, e una incidenza molto più bassa ma individuabile nel DNA da sangue. Abbiamo poi dimostrato il verificarsi di delezioni terminali a frequenza elevata in altre sequenze genomiche con elevato potenziale per la formazione di G-tetraplex. Intendiamo utilizzare le metodiche sviluppate per questa analisi per lo studio del coinvolgimento di BRIP1 nella destabilizzazione di specifiche sequenze G-quadruplex nel genoma umano.

Attività previste

Vogliamo eventualmente investigare: 1) il coinvolgimento di BRIP1 nella destabilizzazione di specifiche sequenze G-quadruplex nel genoma umano in linee cellulari da soggetti con FA (Risultato atteso: chiarire in parte le basi molecolari della specificità fenotipica delle mutazioni di BRIP1 rispetto a mutazioni di altri geni che causano FA); 2) il livello di riarrangiamenti coinvolgenti sequenze G-tetraplex nei tessuti somatici e germinali di portatori sani di mutazioni di BRIP1 (Risultato atteso: quantificare il rischio di riarrangiamenti patologici nei portatori (tumori) e nella loro progenie (patologie cromosomiche)); 3) l'associazione tra polimorfismi del gene e la frequenza di riarrangiamenti in un gruppo di genitori di soggetti con riarrangiamenti cromosomici, incluso un sottogruppo di soggetti con riarrangiamenti a livello di regioni G-quadruplex, e un gruppo di soggetti di controllo (Risultato atteso: verifica dell'esistenza di una associazione tra determinati alleli di BRIP1 e un aumento del rischio di riarrangiamenti costituzionali).

Per motivi sia di budget che organizzativi, la Ricerca si focalizzerà inizialmente sul primo dei tre obiettivi, prevedendo un aumento degli obiettivi e del budget nel caso di risultati preliminari positivi.

Coinvolgimento di BRIP1 nella destabilizzazione di specifiche sequenze G-quadruplex nel genoma umano in linee cellulari da soggetti con anemia di Fanconi (FA).

Gli studi finora condotti su linee cellulari tratte da pazienti con varie forme di FA hanno analizzato mediante array-CGH la presenza e l'estensione di delezioni cromosomiche interstiziali. Questo metodo rende possibile l'esame della presenza di delezioni nell'intero genoma, ma non permette di analizzare la frequenza di una singola delezione in linee diverse o in condizioni di coltura modificate. Il progetto si propone di analizzare la frequenza di delezione di specifiche regioni del genoma umano contenenti sequenze con il potenziale per formare strutture G-quadruplex. Utilizzeremo linee cellulari anonime ricavate da pazienti con FA di gruppi di associazione diversi, tutte disponibili da banche di linee utilizzabili per progetti di ricerca. Alcune delle linee disponibili provengono da pazienti con anemia di Fanconi che possiedono due copie di un allele mutato. Altre linee disponibili sono state ottenute da genitori e parenti portatori sani eterozigoti per la stessa mutazione. Questo permetterà di valutare la differenza nel grado di destabilizzazione tra affetti e portatori eterozigoti.

L'analisi molecolare dell'incidenza di delezioni terminali in SHANK3 e in altri loci nel DNA estratto da linea sarà condotta come segue: DNA genomico estratto con protocolli standard sarà quantificato su Nanodrop N1000. L'amplificazione delle delezioni sarà eseguita con il protocollo per la nested

ACP-PCR per telomeri descritto in Bonaglia et al. (2006), limitato a una sola amplificazione PCR nested. I prodotti amplificati saranno separati su gel di agaroso 1.5% in TAE e visualizzati su un transilluminatore a UV o trasferiti su membrana (Hybond N+) e ibridizzati a una sonda specifica con metodiche non radioattive. Amplificheremo anche la regione di delezione dell'alfa globina come controllo per il tasso di mutazione non correlato alla presenza di sequenze G-quadruplex, utilizzando il metodo elaborato da Lam e Jeffreys (2006). Confronteremo la frequenza di delezione in linee cellulari contenenti mutazioni in BRIP1, WRN e BLM e linee non mutate. L'esperimento verrà poi ripetuto dopo aver trattato le linee con mutageni per evidenziare con maggiore chiarezza il difetto nella riparazione del DNA.

Referenze

Bonaglia MC, Giorda R, Mani E, Aceti G, Anderlid BM, Baroncini A, Pramparo T, Zuffardi O (2006) Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *J Med Genet* 43:822-828.

Lam KW, Jeffreys AJ (2006) Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of {alpha}-globin gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:8921-8927

STUDIO DI TECNOLOGIE UTILIZZABILI ALL'INTERNO DI CAMPI MAGNETICI AD ALTA INTENSITÀ

SIG. MATTEO CAVALLERI

E-MAIL: MATTEO.CAVALLERI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 6
Bioingegneria

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: Unità di Neuroimaging - CeSNE

DESCRIZIONE

Le tecnologie che permettono la diagnostica per immagini sono diventate uno strumento sempre più irrinunciabile nell'attività clinica e diagnostica grazie alla loro capacità di osservazione di aree dell'organismo non altrimenti visibili.

Tra queste tecnologie, la risonanza magnetica nucleare (NMR) è qualitativamente la più accurata nell'indagine dei tessuti molli rispetto alla tomografia computerizzata o alla tecnica radiologica. Il principio della NMR consiste nel porre un paziente in un campo magnetico ad alta intensità e contestualmente indagare la precessione dello spin dei protoni sotto l'effetto di tale campo. Sebbene i risultati prodotti dagli strumenti di NMR siano estremamente dettagliati, la necessità di immergere il paziente in un campo magnetico ad alta intensità crea molteplici problemi pratici, tra cui l'impossibilità d'utilizzo di qualsivoglia elemento metallico.

Questo limite è maggiormente restrittivo nel momento in cui si vogliono indagare funzioni di tipo cognitivo: vi è infatti una penalizzazione rispetto agli esami effettuati con gli strumenti tradizionali in cui si erogano degli stimoli ai pazienti e successivamente si rilevano le loro risposte.

Per esempio sono fortemente limitati la stimolazione mediante dispositivi elettronici pilotati da personal computer (come monitor, cuffie audio, emettitori di luce, etc...) e l'utilizzo di pulsanti per indagare le risposte comportamentali da parte del paziente.

A queste restrizioni si aggiunge la complicazione derivante dal fatto che il paziente è visibile con difficoltà dall'esterno, trovandosi inserito durante l'esame all'interno del toroide del magnete. Anche gli spazi a disposizione all'interno

del toroide sono fortemente limitati.

La presenza del campo magnetico ad alta intensità richiede dunque una riprogettazione dei dispositivi di stimolazione ed acquisizione.

Nel corso del progetto, iniziato nell'anno 2009, si sono analizzati i vincoli di uno strumento di tipo slit-scanner durante l'impiego in un dispositivo di risonanza magnetica e si è cercato di superare tali limitazioni impiegando alcune soluzioni innovative.

Nel corso del 2010 ci si propone un completamento del lavoro iniziato nell'anno 2009, in particolare rispetto alla schermatura elettromagnetica necessaria al funzionamento di tale dispositivo nel campo ultraalto. Compatibilmente con il tempo a disposizione, si prevede la prosecuzione di test impieganti ulteriori tecnologie di trasmissione dati all'interno del dispositivo di RM.

Risultati e prodotti conseguiti

Durante lo scorso anno sono state identificate le tecnologie più idonee per essere adottate all'interno di campi magnetici ultraalti. Tra queste tecnologie sono state valutate le soluzioni, i sensori, i componenti elettronici, i circuiti MEMS che si sarebbero potuti utilmente impiegare anche nello sviluppo di dispositivi originali innovativi

È stato preso in considerazione un dispositivo convenzionale di tipo "slit-scanner" e sono stati analizzati gli impedimenti per il suo impiego all'interno della risonanza magnetica, come ad esempio la presenza di parti in movimento motorizzate, l'eccessivo ingombro, la necessità di utilizzare un personal computer per l'analisi dell'immagine, la sensibilità alla radiazione elettromagnetica.

Si è cercato di conseguenza di eliminare alcune di queste limitazioni riprogettando alcune parti del dispositivo tradizionale in modo da:

1. eliminare parti in movimento, in particolare sostituendo la riga proiettata da un diodo laser movimentata con un servomotore con un microproiettore con tecnologia micromirrors.
2. ridurre l'ingombro e la complessità di una telecamera gigabit mediante l'utilizzo di una telecamera analogica dalle dimensioni più contenute ed una opportuna circuiteria analogica per la gestione del segnale video-composito
3. ridurre notevolmente le dimensioni del sistema e la richiesta della potenza di calcolo mediante una innovativa metodologia di misurazione dei punti basata sull'analisi del segnale videocomposito effettuata da un FPGA

Ciò ha permesso di realizzare un dispositivo con caratteristiche originali che hanno portato ad una registrazione di brevetto industriale.

Attività previste

Il prototipo è stato verificato sperimentalmente in laboratorio attraverso le simulazioni della rete logica che successivamente dovrà essere sintetizzata su FPGA. Si intende migliorare il prototipo creando un hardware in grado di funzionare in autonomia nel locale dove opera l'apparecchiatura di risonanza magnetica. Si intende migliorare il dispositivo con una serie di automatismi (per esempio il calcolo automatico del valore di sogliatura). Si cercherà di fornire una adeguata schermatura per un utilizzo all'interno della risonanza magnetica.

Nel corso dei lavori si potranno sperimentare anche diversi tipi di comunicazione (compatibile con i campi ultraalti) tra l'apparecchiatura inserita all'interno della risonanza magnetica ed i dispositivi riceventi esterni.

IDENTIFICAZIONE E STUDIO DI REGIONI SOTTOPOSTE A SELEZIONE NATURALE NEL GENOMA UMANO, CARATTERIZZAZIONE DI VARIANTI FUNZIONALI E ASSOCIAZIONE CON TRATTI FENOTIPICI

DR.SSA MANUELA SIRONI

E-MAIL: MANUELA.SIRONI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 7

Bioinformatica

Periodo di svolgimento

2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Centro Dino Ferrari, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano; IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli and Regina Elena (Prof. Giacomo P. Comi)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, LITA, Segrate – Università degli Studi di Milano; IRCCS Santa Maria Nascente, Fondazione Don C. Gnocchi, Milano (Prof. Mario Clerici)

Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Università Studi di Milano (Prof. Fabio Macciardi)

Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation, Barcellona (Dr. Mario Caceres)

DESCRIZIONE

L'interesse nello studio della variabilità genetica umana e nella comprensione dei processi evolutivi sottostanti risiede non solo in una curiosità scientifica riguardo all'evoluzione della nostra specie, ma soprattutto nella possibilità di identificare nuove varianti funzionali con particolare riferimento a varianti geniche protettive o predisponenti per alcune malattie complesse.

Allo stato attuale sono stati individuati più di 12 milioni di SNP (polimorfismi a singolo nucleotide) nel genoma umano. Non è semplice distinguere tra SNP funzionali e non e, tra i primi, evidenziare su quali abbia agito un processo selettivo.

Analizzando i polimorfismi umani è possibile risalire alle forze evolutive che, nel corso del tempo, hanno modellato l'attuale variabilità genetica ed identificare quali varianti siano effettivamente funzionali. In accordo con tali osservazioni, sono state recentemente proposte teorie "evolutive" per spiegare l'insorgenza di numerose malattie comuni nell'uomo quali, ad esempio, ipertensione, malattie autoimmuni/allergie, schizofrenia, depressione, sindrome

metabolica. Il laboratorio di bioinformatica ha messo a punto strumenti computazionali in grado di identificare le regioni sottoposte a selezione naturale e studiarne le caratteristiche. Progetti in questo ambito sono già in corso e rappresentano un continuum rispetto alla nostra precedente attività (progetto di RC2008 "Identificazione, analisi e caratterizzazione funzionale di SNPs, MCS e elementi trasponibili nel genoma umano: le potenzialità dell'uso combinato di divergenza interspecifica e variabilità intraspecifica).

In particolare, abbiamo applicato un approccio innovativo che prevede l'utilizzo di strumenti di genetica di popolazione per identificare i geni che sono stati sottoposti a selezione, partendo dal presupposto che le forze selettive agiscono su un locus specifico appunto perché tale locus contiene una variante polimorfica funzionale e che tali forze lasciano un "segno" che può essere utilizzato per identificare le varianti selezionate. È noto che, durante la storia evolutiva dell'uomo, pathways specifici fondamentali per la sopravvivenza sono stati soggetti a pressione selettiva, ed è per questo che abbiamo applicato le metodiche di genetica di popolazione a geni di interesse biomedico quali, ad esempio, geni coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa, nel pathway della coagulazione e fibrinolisi, nella regolazione metabolica. Abbiamo inoltre studiato i geni coinvolti nella risposta immune e nell'autoimmunità. Si ritiene che le malattie infettive abbiano rappresentato una delle maggiori minacce per le popolazioni umane e che abbiano agito come una potente forza selettiva. A tutt'oggi malgrado i progressi nel trattamento e nella prevenzione, le malattie infettive sono responsabili di circa il 48% delle morti nel mondo tra gli individui di età inferiore ai 45 anni. È perciò possibile che l'esposizione ai parassiti (batteri, virus, protozoi e elminti) abbia rappresentato la forza selettiva alla base dell'evoluzione di diversi geni, in primis quelli coinvolti nella risposta immunitaria, e che le tracce lasciate da questi patogeni renda oggi più predisposte le popolazioni umane all'insorgenza di diverse malattie complesse sia tradizionalmente riferite all'ambito immunologico (malattie autoimmuni, asma, atopia, allergia) sia legate ad altri ambiti (tumori, ictus, obesità, depressione, autismo).

Risultati e prodotti conseguiti

Il modello neutrale dell'evoluzione molecolare afferma che la maggior parte delle variazioni alleliche sono una conseguenza del processo di deriva genetica per la quale tutte le mutazioni sono non adattative ed insorgono e si fissano nel tempo in modo casuale.

Oltre ai processi casuali, durante l'evoluzione possono concorrere differenti forme di selezione naturale che modificano le variazioni nucleotidiche intra ed inter-specie. La selezione negativa tende a eliminare alleli deleteri, mentre

la selezione positiva favorisce la fissazione di uno o più alleli con maggior fitness. Infine, la selezione bilanciante è un processo per cui la variabilità genetica è mantenuta all'interno di una popolazione a causa di una pressione selettiva. Esistono tre principali cause per l'instaurarsi della selezione bilanciante: sovradominanza (gli individui eterozigoti possiedono un vantaggio selettivo sugli omozigoti), frequenza-dipendenza (un vantaggio è conferito ad un allele raro), variazione ambientale (alleli differenti sono vantaggiosi in diversi ambienti).

Le metodiche utilizzate per lo studio delle regioni genomiche sottoposte a selezione naturale sono quelle classiche della genetica di popolazione. Esse si basano su diversi principi: 1) Diverse forme di selezione possono alterare lo spettro atteso di frequenze alleliche, pronunciando il picco alle basse frequenze, spostando lo spettro verso frequenze intermedie o producendo un eccesso di alleli derivati ad alta frequenza. Varie statistiche (i.e. Tajima's D; Fu and Li's D and F; Fay and Wu's H) sono state proposte con l'obiettivo di verificare se lo spettro osservato rifiuta l'ipotesi di evoluzione neutra. 2) In caso di evoluzione neutrale, il numero atteso di polimorfismi intra-specie e di sostituzioni fissate inter-specie è correlato in quanto entrambi dipendono dal tasso di mutazione. Eventi selettivi possono variare tale rapporto: ad esempio in caso di selezione bilanciante si osserva un eccesso di polimorfismi rispetto a variazioni fissate mentre l'opposto si verifica in caso di sweep selettivo (test HKA (Hudson-Kreiman-Aguadè)). 3) Diversi regimi selettivi possono originare genealogie aplotipiche specifiche. Ad esempio, nel caso di uno sweep selettivo si può spesso osservare un aplotipo principale che segrega nella popolazione ed è caratterizzato da bassa variabilità, mentre gli aplotipi minoritari mantengono normali livelli di diversità; al contrario, nel caso di selezione bilanciante, si possono osservare due o più cladi con un tempo di coalescenza inusualmente profondo. 4) L'estensione del linkage disequilibrium può essere influenzata dai processi selettivi e, in particolare, aplotipi estesi si osservano in caso di sweep selettivi recenti.

Tutti questi test vengono effettuati a partire da dati di risequenziamento; la regione genomica candidata deve essere quindi risequenziata in un numero sufficientemente alto di soggetti non imparentati e appartenenti a gruppi etnici definiti. Abbiamo quindi svolto le nostre analisi su DNA genomico ottenuto da repositories dedicati (Coriell Institute for Medical Research e ECACC) e appartenente ai soggetti che rappresentano i principali gruppi etnici umani (Africani, Caucasic, Asiatici) più altri gruppi minoritari (Indigeni Americani e Aborigeni Australiani).

Per quanto riguarda l'analisi computazionale, l'implementazione di nuovi algoritmi, come la manipolazione dei dati e le analisi statistiche sono state effettuate in ambiente R. Inoltre apposite funzioni in linguaggio R sono state

scritte per interfacciare i principali programmi di analisi basati su una libreria di classi in C++.

Il progetto che presentiamo rappresenta un continuum del progetto di RC2008 ("Identificazione, analisi e caratterizzazione funzionale di SNPs, MCS e elementi trasponibili nel genoma umano: le potenzialità dell'uso combinato di divergenza interspecifica e variabilità intraspecifica). Nel progetto RC2008 ci siamo occupati di studiare geni o famiglie geniche di interesse biomedico quali ad esempio i geni coinvolti nell'ipertensione e nelle malattie cardiovascolari, i geni della super-famiglia delle interleuchine e di antigeni per i gruppi sanguigni, geni associati a malattie psichiatriche quali la schizofrenia.

I risultati ottenuti indicano che i geni ACE (angiotensin converting enzyme), CPB2 (carboxypeptidase B), AVPR1B (vasopressin receptor type 2b), MEFV (Mediterranean Fever), DEFB1 (defensin B1), THBS4 (trombospondin 4) e ADRB2 (beta adrenergic receptor 2) sono stati sottoposti a selezione bilanciante. I geni ADRB3 (beta adrenergic receptor 3), SLC12A1 (Solute carrier 12 A1) e AHI1 (Abelson helper integration site 1) hanno invece subito uno sweep selettivo. Inoltre, l'analisi dei loci che codificano per gli antigeni dei gruppi sanguigni (29 sistemi nell'uomo) ha indicato che molti di questi geni sono stati sottoposti a una pressione selettiva da parte dei patogeni e a selezione bilanciante. Similmente molti geni che codificano per interleuchine o loro recettori sono stati sottoposti a selezione dipendente dai patogeni e, in questo caso, gli elminti hanno rappresentato una pressione selettiva più forte rispetto a virus e batteri. Infine abbiamo verificato che 6 su 9 alleli di rischio per il morbo di Crohn o la celiachia, localizzati nei geni delle interleuchine, sono significativamente associati alla ricchezza di micro-patogeni (virus/batteri/funghi/protozoi). Questi dati supportano quindi l'ipotesi dell'igiene per queste due patologie (che condividono alcuni alleli di suscettibilità) e rappresentano la prima prova "genetica" per tale teoria.

Come accennato sopra, si ritiene che le malattie infettive abbiano rappresentato una delle maggiori minacce per le popolazioni umane e che l'esposizione ai parassiti (batteri, virus, protozoi e vermi) abbia rappresentato la forza selettiva alla base dell'evoluzione di diversi geni, in primis quelli coinvolti nella risposta immunitaria. È dunque possibile che diversi geni umani siano evoluti in risposta a agenti infettivi (microbi/virus) e alla presenza parassiti (elminti) e che nella società moderna una minore esposizione agli agenti infettivi risulti in uno sbilanciamento del sistema immunitario con il risultato di un aumento di malattie autoimmuni, allergiche e di altre patologie. Un approccio possibile per l'identificazione di varianti geniche che modulano la suscettibilità alle malattie infettive è quella di esplorare i segni di selezione "lasciati" dai patogeni sui geni umani. Ovvero l'identificazione di uno o più alleli umani che determinano un aumento o una riduzione della suscettibilità ad essere infettati o che

influenzano la severità del decorso della malattia risultante. Una possibilità per identificare le varianti selezionate dai patogeni è quella di cercare attraverso le correlazioni tra variabili genetiche e la stima delle pressioni selettive esercitate dagli agenti infettivi (protozoi, virus, elminti).

I risultati conseguiti sono stati raccolti e pubblicati nei seguenti lavori:

Pozzoli U, Fumagalli M, Cagliani R, Comi GP, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. The role of protozoa-driven selection in shaping human genetic variability. *Trends Genet*, in press

Fumagalli M, Pozzoli U, Cagliani R, Comi GP, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. Genome-wide identification of susceptibility alleles for viral infections through a population genetics approach. *PLoS Genet*, in press.

Cagliani R, Fumagalli M, Riva S, Pozzoli U, Comi GP, Bresolin N, Sironi M. Genetic variability in the ACE gene region surrounding the Alu I/D polymorphism is maintained by balancing selection in human populations. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Dec 24. [Epub ahead of print]

Fumagalli M, Cagliani R, Pozzoli U, Riva S, Comi GP, Menozzi G, Bresolin N, Sironi M. A population genetics study of the familial Mediterranean fever gene: evidence of balancing selection under an overdominance regime. *Genes Immun*. 2009 Dec;10(8):678-86.

Cagliani R, Fumagalli M, Pozzoli U, Riva S, Comi GP, Torri F, Macciardi F, Bresolin N, Sironi M. Diverse evolutionary histories for beta-adrenoreceptor genes in humans. *Am J Hum Genet*. 2009 Jul;85(1):64-75.

Fumagalli M, Pozzoli U, Cagliani R, Comi GP, Riva S, Clerici M, Bresolin N, Sironi M. Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *J Exp Med*. 2009 Jun 8;206(6):1395-408.

Cagliani R, Fumagalli M, Pozzoli U, Riva S, Cereda M, Comi GP, Pattini L, Bresolin N, Sironi M. A complex selection signature at the human AVPR1B gene. *BMC Evol Biol*. 2009 Jun 1;9:123.

Fumagalli M, Cagliani R, Pozzoli U, Riva S, Comi GP, Menozzi G, Bresolin N, Sironi M. Widespread balancing selection and pathogen-driven selection at blood group antigen genes. *Genome Res*. 2009 Feb;19(2):199-212.

Inoltre tre lavori sono attualmente in press e in fase di review:

Cagliani R, Fumagalli M, Riva S, Pozzoli U, Fracassetti M, Bresolin N, Comi GP, Sironi M. - Haplotype-specific exon skipping of CPB2 exon 7 is maintained by balancing selection. *Mol Biol Evol*, in press

Fumagalli M, Pozzoli U, Cagliani R, Comi GP, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. The landscape of human genes involved in the immune response to parasitic worms and their role in asthma and allergy. *J Immunol.*, under review.

Torri F, Akelai A, Lupoli S, Sironi M, Fumagalli M, Amann-Zalcenstein D, Osimo E, Dal Fiume C, Ben-Asher E, Kanyas K, Cagliani R, Cozzi P, Strik Lievers L, Salvi E, Orro A, Beckmann JS, Lancet D, Kohn Y, Ebstein RB, Lerer B, Macciardi F. Fine Mapping of AHI1 as a Schizophrenia Susceptibility Gene: from Association to Evolutionary Evidence. *FASEB J.*, in press

Per quanto riguarda THBS4 e SLC12A1, sono in corso ulteriori esperimenti finalizzati all'individuazione degli SNP funzionali selezionati; a tal fine abbiamo avviato una collaborazione con il Dott. Caceres (Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation, Barcellona) e con il gruppo del Prof. Macciardi (Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Università Studi di Milano) per lo studio rispettivamente di THBS4 e SLC12A1.

Attività previste

In questo anno ci proponiamo di applicare approcci di genetica di popolazione per descrivere la storia evolutiva di diversi geni e famiglie geniche focalizzando la nostra attenzione sui geni che costituiscono il pathway di coagulazione e del complemento (coinvolti nella patogenesi di malattie quali ictus e trombosi) e su geni di predisposizione o protezione a malattie autoimmuni (es. sclerosi multipla, morbo di crohn, celiachia) e a malattie complesse in generale (es. autismo, ADHD, schizofrenia, depressione). Abbiamo inoltre sviluppato un database di variabili ambientali e varianti geniche genotipizzate in 52 popolazioni umane al fine di studiare l'influenza dell'ambiente sulla variabilità genetica.

L'obiettivo del progetto per il prossimo anno consiste quindi nel risequenziamento e nell'analisi attraverso le metodiche sopra descritte di geni o famiglie geniche di interesse biomedico. Una volta identificata una regione sottoposta a selezione sarà poi necessario individuare, al suo interno, la variante funzionale. A tale scopo verranno applicati sia algoritmi di predizione, sia test

in vitro. Per quanto riguarda gli approcci in vitro, essi si baseranno fondamentalmente su esperimenti di real-time PCR e splicing assays.

Il nostro interesse sarà rivolto all'analisi dei geni e delle rispettive varianti che contribuiscono alla cascata del complemento e della coagulazione. Il pathway è costituito da 69 geni: i dati di risequenziamento di 38 di questi geni sono già disponibili on-line in quanto rientrano in un programma di SNP discovery and genotyping (SeattleSNP: <http://pga.gs.washington.edu/>; PARC: <http://droog.gs.washington.edu/parc/>); 24 geni saranno risequenziati dal nostro gruppo; 7 geni sono stati esclusi dal risequenziamento perchè localizzano in regioni genomiche che mostrano variazione nel numero di copie (copy number variants, CNV) o estensiva omologia con altri geni/regioni geniche. Il programma di risequenziamento è già avviato ed è ora in corso e si protrarrà per parte del prossimo anno l'analisi dei dati di risequenziamento mediante metodiche classiche di genetica di popolazione.

Dati promettenti derivano dall'analisi del gene che codifica per il kininogeno1 (KNG1). KNG1 mediante splicing alternativo genera due isoforme principali: un'isoforma ad alto peso molecolare (HMWK) e una a basso peso molecolare (LMWK).

L'isoforma HMWK svolge diverse funzioni: anticoagulante, profibrinolitica, antiadesiva e proinfiammatoria. L'isoforma LMWK invece non è coinvolta nel processo di coagulazione.

Varianti/aplotipi nel KNG1 sono stati associati a ipertensione, nefropatie diabetiche e malattie cardiovascolari.

L'analisi dei dati di risequenziamento nella popolazione caucasica e nella popolazione afroamericana, disponibili in Seattle SNP, ha permesso l'identificazione di una regione di circa 5kb in selezione bilanciante. Tale regione è compresa tra gli esoni 2-4 e contiene uno SNP non sinonimo a frequenza intermedia. In questo anno abbiamo risequenziato la medesima regione di 5Kb in una popolazione africana (Yoruba) e in 20 individui asiatici. I test di neutralità applicati ai risultati ottenuti indicano che la regione del gene KNG1 compresa tra l'esone 2 e 4 è in selezione bilanciante in tutte le popolazioni considerate. L'obiettivo è ora quello di identificare il polimorfismo funzionale.

Inoltre, in questo anno la nostra attenzione si focalizzerà anche sullo studio di regioni geniche contenenti varianti predisponenti o protettive a malattie autoimmuni. Mediante un primo studio dei lavori presenti in letteratura e un'attenta analisi dei geni associati a malattie autoimmuni in lavori di genome-wide association study (GWAS), abbiamo selezionato alcuni geni che per la loro funzione, per l'associazione con le malattie autoimmuni/allergiche e per la struttura stessa del gene riteniamo che debbano essere studiati. Tra questi il gene IFIH1 è stato associato al diabete di tipo 1 e alla malattia di

Graves, oltre ad essere implicato nel riconoscimento dei virus ad RNA e nella risposta antivirale dell'ospite; ERAP2 agisce sui precursori delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I favorendo la conversione dei precursori a peptidi antigenici, varianti in ERAP2 sono state associate alla spondilite anchilosante; le medesime varianti in TAP2 possono essere protettive contro la sclerosi multipla e le patologie tiroidee autoimmuni ma predisponenti per altre malattie autoimmuni quali il diabete di tipo I, l'artrite reumatoide e la spondilite anchilosante.

Per quanto riguarda lo studio di geni coinvolti nella patogenesi della sclerosi multipla (SM), nel nostro lavoro sopracitato (Genome-wide identification of susceptibility alleles for viral infections through a population genetics approach, PLoS Genet, in press) abbiamo notato un overlap significativo tra i geni sottoposti a selezione naturale mediata da virus e geni associati a SM. Ci proponiamo quindi di approfondire tale osservazione con studi mirati di genetica di popolazione sui singoli geni identificati. Abbiamo inoltre intrapreso l'analisi del gene RAC2, che codifica per una GTPasi della famiglia RAS coinvolta nella regolazione della risposta immunitaria e nei processi infiammatori. Similmente, abbiamo in corso lo studio di un gene che è coinvolto nella risposta a virus neurotropici e ci proponiamo di studiare il ruolo delle varianti funzionali del gene sulla suscettibilità alle encefaliti virali.

Abbiamo inoltre intrapreso uno studio di genetica di popolazione sul gene SNAP25 che codifica per una proteina della membrana presinaptica coinvolta nel rilascio dei neurotrasmettitori. Variazioni polimorfiche di SNAP25 sono state associate a ADHD.

Per quanto riguarda autismo e schizofrenia, il progetto si propone di integrare dati di genetica di popolazioni con dati clinici e immunologici al fine di meglio comprendere il ruolo dei processi immunitari/infiammatori nella patogenesi di entrambe le patologie.

RNA E STRUTTURA SECONDARIA: NUOVI TARGET MUTAZIONALI PER LE MALATTIE GENETICHE

ING. UBERTO POZZOLI

E-MAIL: UBERTO.POZZOLI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 7

Bioinformatica

Periodo di svolgimento

2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Centro Dino Ferrari Dip. Scienze neurologiche Università degli Studi di Milano (Prof. G.P. Comi)

Dip. di Fisica Teorica Università di Torino (Prof. Michele Caselle)

DESCRIZIONE

Il normale funzionamento delle cellule dipende dalla precisa espressione di un gran numero di protein-coding RNA (RNA messaggero) e di noncoding RNA (snRNA, miRNA, etc...). Questi RNA partecipano a importanti meccanismi quali la trascrizione, il processamento dell'RNA stesso e la traduzione. Gli RNA esistono, nelle cellule, sotto forma di complessi ribonucleoproteici composti da uno o più RNA e da numerose proteine RNA-binding. Le ribonucleoproteine (RNPs) sono la forma funzionale degli RNA: dato il gran numero di RNA e di proteine RNA-binding, la loro biogenesi deve essere controllata con grande accuratezza: qualsiasi mutazione che ne distrugga anche solo un componente, sia esso un RNA o una proteina o un fattore necessario al loro assemblaggio può essere deleterio per la cellula e causare malattie. In particolare lungo le sequenze non-coding dei geni (introni e UTR) esistono un gran numero di elementi di sequenza che fungono da binding site per RNPs che svolgono importanti funzioni nella regolazione della trascrizione consentendo tra l'altro l'espressione differenziale di diverse isoforme del gene. In genere questi elementi sono identificabili mediante l'utilizzo di matrici di consenso applicate alla sequenza. Tanto più un frammento di sequenza assomiglia all'elemento cercato tanto più alto è il punteggio che queste matrici forniscono. Tuttavia un aspetto importante da considerare è la conformazione che l'RNA assume durante la trascrizione (struttura secondaria): infatti, un elemento di sequenza identificato come binding site, potrebbe trovarsi in una regione poco o nulla accessibile a causa della struttura che assume

l'RNA. Tale struttura secondaria a sua volta dipende da tutto il contesto di sequenza in cui il particolare elemento si trova. Un elemento può quindi essere inattivato anche se di per se presenta un sequenza che, in un altro contesto, funzionerebbe perfettamente. La struttura secondaria è in buona misura dipendente dalla sequenza circostante ed è quindi possibile che una mutazione nelle vicinanze del motivo lo renda accessibile o, viceversa, inaccessibile modificando la struttura secondaria dell'RNA: in entrambi i casi con possibili effetti patologici. Con questo progetto intendiamo sfruttare le competenze acquisite nello studio delle sequenze non-coding per analizzare sequenze genomiche identificando i motivi più importanti (fattori di trascrizione, fattori di splicing, miRNA) individuandone la posizione e la struttura secondaria del loro contesto selezionando così quelli che sono più probabilmente funzionali. Allo stesso tempo individueremo regioni che, se mutate, potrebbero portare all'inattivazione di un motivo funzionale o, viceversa all'attivazione di uno non funzionale. Verrà compilato un database di regioni candidate per consentire la mappatura su queste regioni delle mutazioni identificate nei pazienti.

Risultati e prodotti conseguiti

Il normale funzionamento delle cellule dipende dalla precisa espressione di un gran numero di protein-coding RNA (RNA messaggero) e di noncoding RNA (snRNA, miRNA, etc...). Questi RNA partecipano a importanti meccanismi quali la trascrizione, il processamento dell'RNA stesso e la traduzione. Gli RNA esistono, nelle cellule, sotto forma di complessi ribonucleoproteici composti da uno o più RNA e da numerose proteine RNA-binding. Le ribonucleoproteine (RNPs) sono la forma funzionale degli RNA: dato il gran numero di RNA e di proteine RNA-binding, la loro biogenesi deve essere controllata con grande accuratezza: qualsiasi mutazione che ne distrugga anche solo un componente, sia esso un RNA o una proteina o un fattore necessario al loro assemblaggio può essere deleterio per la cellula e causare malattie. In particolare lungo le sequenze non-coding dei geni (introni e UTR) esistono un gran numero di elementi di sequenza che fungono da binding site per RNPs che svolgono importanti funzioni nella regolazione della trascrizione consentendo tra l'altro l'espressione differenziale di diverse isoforme del gene. In genere questi elementi sono identificabili mediante l'utilizzo di matrici di consenso applicate alla sequenza. Tanto più un frammento di sequenza assomiglia all'elemento cercato tanto più alto è il punteggio che queste matrici forniscono. Tuttavia un aspetto importante da considerare è la conformazione che l'RNA assume durante la trascrizione (struttura secondaria): infatti, un elemento di sequenza identificato come binding site, potrebbe trovarsi in una regione poco o nulla accessibile a causa della struttura che assume

l'RNA. Tale struttura secondaria a sua volta dipende da tutto il contesto di sequenza in cui il particolare elemento si trova. Un elemento può quindi essere inattivato anche se di per se presenta un sequenza che, in un altro contesto, funzionerebbe perfettamente. La struttura secondaria è in buona misura dipendente dalla sequenza circostante ed è quindi possibile che una mutazione nelle vicinanze del motivo lo renda accessibile o, viceversa, inaccessibile modificando la struttura secondaria dell'RNA: in entrambi i casi con possibili effetti patologici. Con questo progetto intendiamo sfruttare le competenze acquisite nello studio delle sequenze non-coding per analizzare sequenze genomiche identificando i motivi più importanti (fattori di trascrizione, fattori di splicing, miRNA) individuandone la posizione e la struttura secondaria del loro contesto selezionando così quelli che sono più probabilmente funzionali. Allo stesso tempo individueremo regioni che, se mutate, potrebbero portare all'inattivazione di un motivo funzionale o, viceversa all'attivazione di uno non funzionale. Verrà compilato un database di regioni candidate per consentire la mappatura su queste regioni delle mutazioni identificate nei pazienti.

Attività previste

Lo scopo di questo progetto è sviluppare un database dettagliatamente annotato con lo scopo di collezionare mutazioni di splicing o in elementi regolatori in geni i cui difetti sono causa di malattie neuromuscolari rare. Questo database sarà integrato con un sistema di predizione capace di fornire indicazioni accurate sul possibile ruolo di una variazione genomica nell'insorgenza di una patologia. Sia il database che il predittore saranno resi disponibili attraverso un sito web e come web service per l'accesso dal semplice browser o da qualunque altro ambiente computazionale. Le API saranno programmate in modo da standardizzare e facilitare l'integrazione di nuovi strumenti di predizione all'interno del sistema e automatizzare compiti come l'annotazione dei trascritti e il recupero delle sequenze, l'addestramento di nuovi algoritmi o di algoritmi già esistenti in modo da sfruttare la crescente quantità di dati disponibili nel database.

Il progetto può essere suddiviso come segue in 8 attività distinte:

Definizione e creazione della struttura del database di mutazioni

Per prima cosa verrà eseguita un'analisi accurata della letteratura riguardante le malattie rare in modo da ottenere informazioni su mutazioni patologiche validate sperimentalmente in relazione al loro ruolo nello splicing e nella regolazione genica. Questa parte è studiata per progettare una struttura capace di catturare la complessità dei meccanismi coinvolti e per stabilire un set minimo di regole in grado di definire una validazione sperimentale effettiva e efficace. Alla fine di questo pacchetto di lavoro dovrà essere definito un

record abbastanza generale da descrivere tutti i casi. Sarà quindi implementato un database SQL (MySQL).

Implementazione dei moduli di addestramento del predittore

Predittori computazionali basati su approcci di tipo machine learning necessitano di essere addestrati su un set di casi positivi (mutazioni con effetto funzionale) così come di casi negativi (mutazioni silenti). I predittori risultanti devono poi essere testati su un set differente di casi (sia positivi che negativi) per valutare le loro proprietà statistiche in termini di accuratezza e sensibilità. Obiettivo di questo pacchetto di lavoro è definire e sviluppare un metodo per sfruttare le informazioni contenute nel database e in altri database di annotazione pubblicamente disponibili per addestrare e validare i predittori: questo richiede l'annotazione dei geni, l'identificazione e la raccolta delle caratteristiche rilevanti, la costruzione di due diversi set di dati per il training e test dei predittori. Questi strumenti saranno utilizzati per l'implementazione del predittore e alla fine del progetto saranno resi disponibili pubblicamente al fine di facilitare l'integrazione di altri algoritmi nel nostro sistema.

Implementazione dei predittori

Utilizzeremo un classificatore SVM (Support Vector Machine) con un ampio numero di variabili (ad esempio, i fattori di splicing) che saranno selezionate sulla base del loro potere discriminante. Tale scelta sarà eseguita su datasets che comprenderanno esoni reali e sequenze molto simili a esoni veri (pseudo-esoni) ma che non subiscono mai lo splicing, scelte in regioni introniche, e controllate con i database di EST in modo da escludere qualsiasi attività di splicing. Una volta identificato tale classificatore, propriamente addestrato e validato, lo utilizzeremo per confrontare le predizioni ottenute per la sequenza wild type con quelle ottenute per la sequenza mutata. Il classificatore SVM può essere usato per valutare la probabilità che una data sequenza appartenga a esoni reali o a pseudo-esoni. Calcoleremo poi la differenza tra le probabilità degli esoni reali e pseudo-esoni. Una variante genica verrà considerata una mutazione di splicing quando queste differenze saranno più elevate di una certa soglia. Le soglie saranno determinate attentamente in modo da classificare correttamente il maggior numero di mutazioni note annotate nel database. In maniera analoga implementeremo il predittore per l'identificazione dei miRNA e delle loro interazioni di regolazione. Integreremo sia l'informazione evolutiva che l'informazione di sequenza e useremo i dati sperimentali esistenti sui geni dei miRNA e le annotazioni dei target come set di validazione per il nostro predittore.

Definizione di una generica interfaccia software al database e ai predittori

Uno degli obiettivi di questo progetto è rendere il database e i predittori di-

sponibili sia per i clinici che per i biologi computazionali. I clinici dovrebbero sfruttare i predittori in modo da ottenere informazioni circa un possibile ruolo patologico di una mutazione. Ciò dovrebbe favorire una più ampia validazione sperimentale di mutazioni causa di patologie che possano essere depositate nel database permettendo ai bioinformatici di usare questi dati per migliorare i loro algoritmi. Tipicamente i clinici utilizzeranno i predittori uno alla volta per l'analisi di una singola mutazione, inoltre utilizzeranno principalmente il database per depositare i loro dati di validazione sulla mutazione. Il punto di vista del biologo computazionale richiederà invece un ampio uso del predittore su una varietà di mutazioni e un'attività abbastanza intensa di interrogazioni al database.

Sviluppo del sito web

Su uno dei server del laboratorio verrà ospitato un sito web con accesso al database di annotazione delle mutazioni. Il sito conterrà un'interfaccia ai predittori che aiuterà gli utenti nello svolgere compiti come la corretta localizzazione della mutazione su uno specifico trascritto, la visualizzazione delle annotazioni del trascritto e l'uso dei predittori. Particolare attenzione verrà data alla rappresentazione dei risultati al fine di renderli rapidamente interpretabili e facilitare la messa a punto delle validazioni sperimentali.

Identificazione delle mutazioni

Analizzeremo i dati di pazienti selezionati da una casistica provenienti dal Centro Dino Ferrari, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano; IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, tale casistica comprende più di 700 pazienti precedentemente registrati in un database che include gli aspetti clinici, biochimici e genetici. Una banca di DNA e una bio-banca di tessuti è disponibile presso lo stesso centro. Gli algoritmi predittivi saranno prima testati su pazienti con mutazioni ben definite e causative della malattia, tali mutazioni potranno essere sia mutazioni missenso che varianti che hanno un effetto già testato a livello del trascritto. Inoltre selezioneremo pazienti con sostituzioni nucleotidiche rispetto alla sequenza di riferimento in geni noti, il cui effetto non è facilmente predicibile, per esempio mutazioni silenziose rare, varianti localizzate nelle giunzioni esone-introne o localizzate nelle regioni introniche. In questi casi il risultato dell'algoritmo di predizione sarà confrontato con i dati ottenuti dall'analisi sull'mRNA del paziente. I predittori saranno inoltre testati sulle sequenze dei pazienti con una presentazione clinica adeguata e che, all'analisi di sequenza, presentano solo varianti con un effetto patogenetico sconosciuto.

Validazione sperimentale

Al fine di verificare se sostituzioni nucleotidiche o micro delezioni/inserzioni

identificate nei pazienti siano responsabili di alterazioni nel processamento dell' mRNA, utilizzeremo due approcci.

Quando l' RNA del paziente è disponibile verificheremo le mutazioni con un potenziale effetto sullo splicing attraverso l'analisi sul trascritto del paziente stesso. Quando le predizioni sono sui miRNA o l'RNA del paziente non è disponibile adotteremo un approccio sperimentale basato sull'utilizzo di mi-nigeni per confermare o confutare le predizioni.

Lista dei target mutazionali predetti

Il risequenziamento dell'intero gene del paziente, nel caso di una malattia monogenica, è ancora troppo costoso e non può essere eseguito di routine. Generalmente vengono sequenziati solo gli esoni e le regioni introniche fiancheggianti. Sfrutteremo i predittori sullo splicing e sui miRNA per individuare nei geni responsabili di malattie rare regioni che, se mutate, possano avere effetti patologici. Questa è un'analisi computazionale abbastanza intensa poiché si basa sull'ipotesi che virtualmente ciascuna posizione può mutare e si propone di valutare l'effetto di ciascuna potenziale mutazione. Per questa ragione lanceremo i nostri predittori sui geni malattia utilizzando il cluster di computer disponibile presso l'Università di Torino. La lista che si otterrà delle regioni candidate potrà essere poi utilizzata dai biologi e clinici per estendere il sequenziamento alla ricerca della mutazione causativa della patologia senza la necessità di sequenziare l'intero gene.

SVILUPPO ATTIVITÀ DI INTEGRAZIONE SCOLASTICA PER ALUNNI CON DISABILITÀ: CONFRONTO TRA METODOLOGIE IN DUE MODELLI REGIONALI DIVERSI

DR. MASSIMO MOLTENI

E-MAIL: MASSIMO.MOLTENI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 8

Organizzazione dei servizi sanitari

Periodo di svolgimento

2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Strutture dell'IRCCS Medea:

U.O. Neuroriabilitazione 2 – Bosisio Parini – dr. Massimo Molteni

UDGE – Conegliano e Pieve di Soligo – dr. Andrea Martinuzzi

Organizzazione dei servizi sanitari – Ing. Damiano Rivolta

Centro Elaborazione Dati – Bosisio Parini – Ing. Gianluigi Reni

DESCRIZIONE

La legge 104/92 è l'atto legislativo quadro che disciplina le modalità attraverso il quale il diritto soggettivo al pieno sviluppo della persona con disabilità è attuato all'interno del percorso scolastico. I successivi provvedimenti normativi hanno cercato di rendere fruibile una serie di atti che in riferimento al PEI consentano il costante monitoraggio delle funzioni degli alunni disabili e un intervento didattico coerente con le abilità possedute. Le strutture sanitarie sono chiamate in causa per offrire una puntuale descrizione del livello funzionale del minore conseguente alla disabilità e per sviluppare un PRI congruo con il Progetto di Vita del soggetto. Spesso, gli indirizzi regionali hanno scelto strade diverse per dare attuazione a questo diritto. La Regione Lombardia ha deciso di non adottare neppure in via sperimentale l'ICF mentre ha delegato a tutti i servizi, sia pubblici che privati che hanno in carico il minore, ossia che ha in essere un percorso continuativo di gestione dei bisogni del paziente, l'attuazione di quanto è di loro competenza. Nella regione Veneto, si è invece deciso di implementare il sistema ICF. In particolare nella provincia di Treviso, con un accordo di programma, si è introdotto un esperimento pilota finalizzato all'introduzione del sistema ICF in ambito di integrazione scolastica. Due sedi Irccs della associazione La Nostra Famiglia, si trovano così a poter sperimentare due modalità differenti di dare attuazione alla integrazione scolastica per i disabili. In particolare, la sede di Bosisio parini, ha avuto autorizzato

dalla asl di Lecco una modalità sperimentale per lo svolgimento della attività di integrazione, mentre la sede di Conegliano, all'interno del citato accordo di programma, ha il compito di - supervisionare, correggere e revisionare il materiale prodotto durante lo scorso anno scolastico dai focus group formati da insegnanti, operatori socio-sanitari e genitori sulla compilazione dei documenti di 4 casi clinici: questo materiale diventerà parte di una guida all'utilizzo dei documenti a disposizione degli insegnanti;- monitorare all'interno della provincia l'utilizzo dei documenti secondo i nuovi modelli elaborando un sistema di raccolta dati sia in ambito scolastico che in ambito socio-sanitario;- verificare la validità e l'efficacia della struttura e della terminologia della classificazione ICF nei nuovi strumenti al fine di valutare eventuali modifiche, come per esempio l'inserimento e l'eliminazione di altri codici. Al fine di valutare l'efficacia delle due sperimentazioni e la replicabilità in altri contesti, si propone un progetto di ricerca organizzativo che preveda la costituzione di una unità organizzativa e operativa dedicata che: - individui i soggetti su cui svolgere la propria azione, facendo da punto di riferimento per le richieste di decine di scuole distribuite sul territorio, - sviluppi un modello di intervento compatibile con le normative esistenti nelle due regioni e soddisfacente rispetto agli obiettivi, - fornisca una risposta adeguata alla integrazione del disabile, - sviluppi una modalità di valutazione funzionale isomorfa alle scelte di politica regionale vigenti verificando la soddisfazione degli utenti finali – scuola e famiglia, in merito alle modalità organizzative sviluppate, - confronti i due modelli sul piano della efficacia e della soddisfazione percepita.

Attività previste

1. Implementazione di una linea telefonica dedicata, su cui far convergere tutte le attività connesse alla integrazione
2. Progettazione e sviluppo di un programma software per la costituzione di una banca dati informatizzata per rendere possibile la gestione di tutte le informazioni cliniche rilevanti ai fini della integrazione scolastica: tale strumento potrà essere proposto anche ai servizi sanitari che si occupano di queste attività.
3. Costituzione di un team di operatori dedicati agli incontri di integrazione scolastica che sviluppino modalità e procedure univoche e sperimentino la griglia ICF per la redazione della diagnosi funzionale.
4. Validazione della attività svolta attraverso questionari di customer.

LA DISABILITÀ NEUROLOGICA DEL PAZIENTE BAMBINO: INDIVIDUAZIONE E SVILUPPO DEI PROBLEMI ETICI E GIURIDICI INERENTI AL PEDIATRIC BIOBANKING

PROF. LEONARDO LENZI

E-MAIL: LEONARDO.LENZI@UNICATT.IT, LEOLENZI@ALICE.IT

Linea di Ricerca n. 9

Bioetica

Periodo di svolgimento

2010

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Ospedali ed enti di ricerca italiani, europei ed eventualmente internazionali che hanno strutture dedicate al biobanking – sia nel senso stretto di “biobanche” sia nel senso di collezioni – che raccolgono, conservano e usano/distribuiscono campioni biologici e dati associati provenienti anche da pazienti minori di età.

DESCRIZIONE

Rispetto al tema della disabilità e, più in generale, della malattia, di carattere neurologico ma anche di altra natura, lo sviluppo delle “biobanche” quali strutture per la raccolta, la conservazione, l'utilizzo e la distribuzione di materiale biologico umano e/o dati associati per finalità cliniche e/o di ricerca, è venuto assumendo un'importanza centrale sia dal punto di vista scientifico (rispetto alle numerose opportunità che la disponibilità di molti campioni e dati offre), sia dal punto di vista etico, giuridico, e più estesamente sociale (rispetto all'analisi di questioni nuove o rinnovate aperte dalla ricerca basata sull'uso di materiale biologico umano e/o dati di carattere personale associati).

Fino ad oggi il dibattito bioetico e sociale inerente al biobanking si è concentrato principalmente su questioni legate all'utilizzo di campioni e dati provenienti da soggetti adulti. Tale orientamento è dipeso da molteplici fattori, fra i quali, primariamente, la necessità di sviluppare una “bioetica generale per le biobanche”, che potesse declinarsi in modo peculiare rispetto a realtà specifiche (ad es., il biobanking pediatrico, il biobanking neuro-psichiatrico, il biobanking legato ad una malattia rara determinata, l'imaging biobank, e altro). Secondariamente, la ritardata attenzione degli scienziati medici e sociali al coinvolgimento dei soggetti minori di età nei programmi di ricerca. In quest'ottica, anche il pediatric biobanking ha cominciato a porsi all'at-

tenzione degli studiosi e a diventare oggetto di studi di carattere teorico ed empirico (Kristien Hens et al., European Journal of Human Genetics, 2009; David Kaufman et al., American Journal of Human Genetics, 2008; Alon B. Neidich et al., American Journal of Medical Genetics, 2008) che hanno contribuito a definire una sorta di core delle biobanche pediatriche, riassumibile in: a) questioni legate alla presa di decisioni rispetto al biobanking (ad es., il modello parentale può ritenersi sempre e comunque lo standard decisionale appropriato? Dovrebbe essere riconosciuta un'autonomia decisionale al paziente- bambino? Come dovrebbe essere gestita la presa di decisioni una volta che il paziente bambino diventa maggiorenne legalmente?), b) questioni legate alla privacy che, nel caso di pazienti-bambini – spesso anche neonati o comunque molto piccoli - , diventa long-term privacy, e dunque pone necessità ulteriori rispetto alla messa a punto di metodi e strumenti appropriati per la gestione dei campioni e dei dati ad essi relativi (doppio codice? Elaborazione di programmi informatici sofisticati?), c) questioni organizzative legate alla gestione di materiali biologici e dati associati sul lungo periodo, strettamente correlate alle problematiche precedentemente richiamate. Rispetto al diverso “campione” da esplorare, il progetto intende utilizzare questionari (da somministrare agli operatori sanitari) e focus group (da utilizzare con le famiglie dei pazienti bambini, al fine di compiere una analisi più approfondita delle opinioni, attitudini e delle motivazioni correlate). L'attenzione al contributo che possono fornire le famiglie dei pazienti si ritiene particolarmente significativa in ragione sia della fascia di età dei pazienti (bambini e giovani adulti), sia della complessità e delicatezza della malattia con la quale essi si trovano a confrontarsi (malattie spesso rare e che provocano disabilità, anche gravi).

Il progetto si propone di descrivere la richiamata analisi in un articolo da proporre sia ad una rivista con impact factor sia ad una rivista non indicizzata. Esso intende inoltre contribuire allo sviluppo di una sensibilità agli aspetti etici, legali e sociali associati al pediatric biobanking, sia attraverso l'organizzazione di work shop sia attraverso lo sviluppo di un network dedicato.

Attività previste

L' “emergenza” di tali questioni, intesa sia come “nuovo emergere”, sia come necessità di munirsi prontamente di strumenti appropriati al coinvolgimento dei bambini e giovani adulti nei programmi di ricerca, unitamente alla circostanza concreta di operare all'interno di un Istituto – quale è l'Istituto “E. Medea” – Associazione La Nostra Famiglia - dedicato alla cura dei bambini, ha motivato la scelta di sviluppare un progetto di ricerca incentrato sulle questioni etiche, giuridiche e sociali relative al biobanking pediatrico.

Tale progetto si propone di studiare tali questioni sia dal punto di vista teorico, sia dal punto di vista empirico.

Sotto il profilo teorico, esso intende approfondire le questioni etiche, giuridiche e sociali legate alla ricerca basata sul biobanking pediatrico, come delineate nella letteratura e come regolate nel contesto nazionale e internazionale.

Sotto il profilo empirico, esso si propone, in una fase 1, di conoscere le pratiche e procedure sviluppate nel campo del biobanking pediatrico e approfondire il punto di vista degli operatori sanitari rispetto a tale tema.

Dopo avere "fotografato" l'esistente in tema di regolamentazioni e pratiche sviluppate nel campo del biobanking pediatrico, il progetto intende, in una 2 fase, esplorare le conoscenze, opinioni e attitudini dei genitori di pazienti bambini e, in generale, minori di età, al fine di approfondire ad un livello motivazionale la precedente analisi. L'integrazione delle due fasi consentirebbe di acquisire un insieme di elementi utili alla messa a punto di una policy dedicata al pediatric biobanking, che tenga conto tanto, da un lato, delle regolamentazioni esistenti, dall'altro delle pratiche sviluppate, e del punto di vista di chi di tali regolamentazioni e pratiche è destinatario, le famiglie e i piccoli paziente, appunto.

STUDIO RM AD ALTA RISOLUZIONE SPAZIALE (3TESLA CON BOBINA 32 CANALI) PER UN MIGLIOR INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO ED INTERVENTI DI RIABILITAZIONE MIRATI E SPECIFICI IN UNA POPOLAZIONE DI SOGGETTI DI ETÀ EVOLUTIVA AFFETTI DA PATOLOGIE CONGENITE ED ACQUISITE

DR. RENATO BORGATTI

E-MAIL: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 10
Neuroimaging

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

DESCRIZIONE

Il progetto è rivolto a bambini che presentano una patologia cerebrale congenita acquisita in epoca pre-perinatale o secondaria acquisita in epoca post natale (esiti di trauma cranio encefalico o di neoplasie ad interessamento primario o secondario del SNC). Inoltre è rivolto allo studio di soggetti affetti da ritardo mentale e/o disturbi del comportamento.

Lo studio prevede l'impiego di un apparecchio a 3 Tesla dotato di bobina dell'encefalo a 32 canali che consente la massima risoluzione spaziale oggi ottenibile con apparecchiature commerciali. La valutazione RM consisterà nella acquisizione di immagini 3D di tutto l'encefalo sia T1 che T2 in alta risoluzione (dimensione del voxel minore di 1 mm sui tre lati). Queste immagini potranno essere successivamente processate sia attraverso una semplice segmentazione per ottenere misurazioni quantitative della sostanza bianca e della sostanza grigia, sia attraverso tecniche di voxel-based-morphometry per evidenziare differenze nella distribuzione regionale della sostanza bianca e della sostanza grigia sia in sede sovratentoriale che a livello tronco-cerebellare.

La complessità dello studio prevede una articolazione in 4 sottoprogetti ognuno dei quali rivolto a popolazioni differenti che verranno reclutate e studiate con obiettivi specifici e che prevedranno protocolli appositamente dedicati. In particolare sono previsti protocolli: per lo studio di una popolazione di età pediatrica non affetta da alcuna patologia; un protocollo per in popolazione pediatrica con patologia neurologica dell'età evolutiva associata a ritardo mentale e/o disturbo del comportamento.

Attività previste

Protocollo 0 - Protocollo di acquisizione di dati morfologico-quantitativi e funzionali cerebrali con tomografo di risonanza magnetica a 3 Tesla (3T) in popolazione pediatrica con normale sviluppo neurologico.

Premessa

Attualmente nella letteratura medica internazionale non sono disponibili data-base consistenti e significativi di RM cerebrali normali in età pediatrica costruiti con apparecchio a 3T. I data-base già acquisiti con apparecchi da 1,5 T purtroppo non sono utilizzabili negli studi neuroradiologici su pazienti pediatrici a 3T, per essenziali differenze quantitative di risoluzione spaziale e risoluzione di contrasto tra le varie strutture cerebrali.

Popolazione coinvolta

Soggetti di età pediatrica sani in un numero più ampio e uniforme possibile

Obiettivi specifici

Costruire un data-base di misure quantitative morfo-funzionali acquisite a 3Tesla, come parametro statistico normale di riferimento cui porre in relazione analoghi dati acquisiti in popolazioni pediatriche con patologie del sistema nervoso centrale congenite ed acquisite.

1. Ottenere dati quantitativi su volumetria cerebrale, tensore di diffusione, spettroscopia e risonanza funzionale (fMRI) nella popolazione pediatrica con normale sviluppo psicomotorio, anamnesi clinica neurologica negativa, esame clinico neurologico negativo.

Protocollo 1: protocollo di acquisizione di dati morfologico-quantitativi e funzionali cerebrali con tomografo di risonanza magnetica a 3 tesla (3t) in popolazione pediatrica con patologia neurologica dell'età evolutiva associata a ritardo mentale e/o disturbo del comportamento.

Premessa

La risonanza magnetica ha permesso di ottenere, negli ultimi due decenni, importanti progressi nell'individuazione delle anomalie morfologiche cerebrali che possono ricorrere nelle patologie neurologiche dell'età evolutiva associate a ritardo mentale e ai disturbi del comportamento [Barkovich 2005, 2007, 2009].

La diagnosi è stata per lo più limitata a quelle classi di patologie in cui la tradizionale osservazione qualitativa da parte degli esperti di neuroimaging poteva fornire informazioni sufficientemente specifiche; gli studi di neuroimaging si sono pertanto concentrati su alterazioni/lesioni/malformazioni che di per se stesse risultavano ben distinguibili rispetto al quadro del normale cervello in via di sviluppo.

Tuttavia dalla pratica clinica quotidiana risulta che, in pazienti affetti da quadri patologici con ritardo mentale, un gran numero di esami di neuroimaging siano giudicati normali, proprio sulla base dei soli tradizionali criteri di valutazione qualitativa. Il numero dei "falsi negativi" risulta significativo (sino ad un 40% a seconda delle casistiche).

Popolazione coinvolta

Soggetti di età pediatrica affetti da ritardo mentale e/o disturbi del comportamento

Obiettivi specifici

1. Costruire un data-base di misure quantitative morfo-funzionali, acquisite a 3 Tesla, su pazienti affetti da patologie dello sviluppo con ritardo mentale e/o disturbi del comportamento
2. Ottenere dati quantitativi su volumetria cerebrale, tensore di diffusione, spettroscopia, fMRI nella popolazione suddetta, da confrontare con le misure ottenute su analoga popolazione di individui sani.
3. Correlare i dati quantitativi di neuroimaging con quelli provenienti dall'analisi genetica correntemente attuata in tali popolazioni.

Protocollo 2: protocollo di acquisizione di dati morfologico-quantitativi e funzionali cerebrali con tomografo di risonanza magnetica a 3 tesla (3t) e bobina di ricezione a 32 canali in popolazione pediatrica con epilessia.

Premessa

L'introduzione nella pratica clinica della RM cerebrale ha permesso negli ultimi due decenni di diagnosticare un'ampia varietà di lesioni cerebrali ed anomalie congenite associate ad epilessia. Tuttavia un numero significativo di pazienti con malattia epilettica presenta quadri RM ottenuti con tecniche tradizionali del tutto normali. A parte le forme di tipo puramente funzionale, una frazione considerevole di questi ultimi pazienti può rientrare nell'ambito delle epilessie criptogenetiche, in cui la lesione od anomalia cerebrale è di dimensioni minime e quindi non visualizzabile con le comuni tecniche di neuroimaging [Duncan 2005].

Abbattere la percentuale di epilessie cosiddette criptogenetiche ed individuare l'eventuale lesione responsabile della sintomatologia è una sfida per il clinico ed il neuroradiologo, che tuttavia è strettamente dipendente dalle tecnologie a sua disposizione. La possibilità di riconoscere lesioni più piccole e meglio caratterizzare lesioni di dimensioni maggiori (displasie corticali focali, polimicrogirie, ecc) risiederebbe anche nell'addizionale approccio quantitativo, relativo cioè ad un studio volumetrico corticale, ottenibile con il nuovo hardware a disposizione ed i recenti software di analisi quantitativa volume-

trica cerebrale [Duncan 2005, Focke 2009].

Popolazione coinvolta

Soggetti di età pediatrica affetti da malformazioni cerebrali o epilessia criptogenica

Obiettivi specifici

1. Acquisire immagini ad elevata risoluzione spaziale in pazienti in età pediatrica, affetti da epilessia/crisi epilettiche.
2. Ottenere dati quantitativi su volumetria corticale cerebrale, tensore di diffusione, spettroscopia e fMRI nella popolazione suddetta, da confrontare con le misure ottenute su analoga popolazione di individui sani.

Protocollo 3: protocollo di acquisizione di dati morfologico-quantitativi e funzionali cerebrali con tomografo di risonanza magnetica a 3 tesla (3t) in popolazione pediatrica con lesioni cerebrali acquisite.

Premessa

Nei pazienti con lesioni cerebrali acquisite (post-traumatiche, post-chirurgiche, perinatali, ecc) l'utilizzo di markers predittivi dell'outcome clinico correlati alle condizioni basali del paziente assume un ruolo strategico nella pianificazione del trattamento riabilitativo.

La Risonanza Magnetica, mediante l'utilizzo di tecniche avanzate morfo-funzionali, può costituire uno strumento utile per la determinazione di tali fattori prognostici. In particolare la tecnica DTI (diffusion tensor imaging) che è in grado di misurare il danno della sostanza bianca e l'integrità dei fasci assiali costituisce a riguardo un interessante metodo di studio. Alterazioni dei patterns di sostanza bianca, monitorate mediante DTI mapping in popolazioni adulte con danno cerebrale di origine traumatica, sono ampiamente riportate in letteratura [Huisman 2004]. Analogo approccio di studio della degenerazione diretta o secondaria (walleriana, ecc) dei fasci di sostanza bianca può essere applicato alla popolazione pediatrica per individuare precocemente patterns che indirizzino la prognosi.

Altra tecnica avanzata morfo-funzionale, la propriamente detta fRM (tecnica BOLD) è invece in grado di monitorare, mediante la stimolazione del paziente durante l'esame, i patterns di attivazione corticale (motori, sensitivi, visivi, del linguaggio, ecc) che sovrintendono le funzioni cognitive superiori. Tale metodica può aiutare a comprendere, mediante la ripetizione seriata degli esami e confronto con analoghi dati su popolazione sana, l'effettiva azione dei trattamenti riabilitativi nella riorganizzazione corticale dei pazienti con lesioni cerebrali acquisite; essa può quindi rappresentare una base oggettiva per la valutazione dell'efficacia del trattamento riabilitativo. È teoricamente

possibile anche valutare e comparare l'azione di trattamenti riabilitativi diversi attuati su classi di pazienti omogenee e confrontabili per tipo di danno.

Infine, grazie alla tecnica della spettroscopia (MR-S) è possibile mappare la presenza a livello dei tessuti cerebrali danneggiati di alcuni metaboliti (N-Acetilaspargato, Colina, Creatina e altri) che sono indicatori della integrità neuronale, del turnover delle membrane cellulari e della funzionalità energetica cellulare. In condizioni di alterato metabolismo energetico e danno strutturale neuronale quali occorrono ad esempio nel trauma, tali markers possono rappresentare uno strumento aggiuntivo per la caratterizzazione e la valutazione prognostica del danno [Suskauer 2009].

Popolazione coinvolta

Soggetti di età pediatrica affetti da lesioni cerebrali acquisite in varie epoche della vita (pre e perinatale o post natale)

Obiettivi specifici

1. Ottenere dati quantitativi su volumetria corticale cerebrale, tensore di diffusione, spettroscopia nella popolazione con danno cerebrale acquisito al fine di a) determinare patterns prognostici, b) monitorare eventuale effetto morfo-funzionale delle terapie riabilitative.
2. Testare, mediante fRM (BOLD), l'attività corticale di specifiche sottoclassi di pazienti con danno cerebrale acquisito e confrontarlo con analoghi dati ottenuti su volontari sani e/o pazienti sottoposti a trattamenti diversi

LA RIABILITAZIONE VISIVA PRECOCE NEL NEONATO CON SOFFERENZA PRE-PERINATALE: STUDIO DELL'EFFICACIA DI DIFFERENTI PROTOCOLLI DI TRATTAMENTO ATTRAVERSO TECNICHE NEUROFISIOLOGICHE E DI NEUROIMAGING (PROBABILISTIC DIFFUSION TRACTOGRAPHY)

DR. RENATO BORGATTI

E-MAIL: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 10
Neuroimaging

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

Collaborazioni

Dipartimento di Psicologia - Università degli Studi di Milano- Bicocca, Italia

DESCRIZIONE

Il sistema visivo, sebbene immaturo alla nascita, costituisce fin da subito uno strumento privilegiato di interazione del bambino con la realtà. Un deficit visivo importante costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo neuropsichico del bambino, influenzando anche lo sviluppo di aree e competenze apparentemente lontane dalla funzione visiva. A questo proposito risulta fondamentale una diagnosi precoce di una condizione di ipovisione, ai fini della pianificazione di trattamento, che intervenga in un periodo cruciale per lo sviluppo visivo. Un intervento predisposto nei primi mesi o anni di vita consente infatti di sfruttare una certa plasticità del sistema che permane fino a circa 6 anni d'età. In un'ottica di riabilitazione è importante tenere conto del ruolo centrale rivestito dalla stimolazione visiva nello sviluppo tipico del sistema visivo. Numerosi studi hanno mostrato gli effetti di una deprivazione sensoriale precoce sia in soggetti animali che in soggetti umani: lo sviluppo delle vie neurali visive è risultato infatti compromesso in bambini deprivati della stimolazione visiva nei primi mesi di vita a seguito di cataratta congenita (Le Grand, Mondloch, Maurer, Brent, 2003; Maurer, Mondloch, Lewis, 2007). Alcuni studi hanno mostrato inoltre l'efficacia di alcuni training di stimolazione visiva proposti a soggetti adulti con gravi deficit visivi, in cui è stato osservato un aumento del campo visivo (Zihl, von Cramon, 1985; Julkunen, Tenovuo, Jääskeläinen, Hämäläinen, 2003). Per quanto riguarda gli effetti di tali trattamenti nei primi mesi di vita, è stata dimostrata l'efficacia di sistematici trai-

ning visivi che possono portare al completo recupero in bambini ipovedenti a seguito di un danno cerebrale pre-perinatale (Werth, Moehrenschrager, 1999; Werth, Seelos, 2005). Un secondo ambito di studi interessante in un'ottica di progettazione di un intervento è quello dell'Environmental Enrichment (EE). Sono numerosi gli effetti documentati a livello neurale in molte specie, tra le quali anche quella umana (van Praag et al., 2000; Nithianantharajah and Hannan, 2006; Sale et al., 2007). Recentemente, alcuni ricercatori hanno indagato l'esposizione di bambini prematuri ad un ambiente arricchito, in termini di massaggio infantile, valutandone gli effetti a livello elettrofisiologico e visivo: i dati mostrano che tale stimolazione multisensoriale influenza lo sviluppo neurale e in particolare lo sviluppo del sistema visivo e l'acuità visiva (Guzzetta et al., 2009).

Il presente studio si propone di documentare gli effetti di un training di stimolazione visiva rivolto a bambini ipovedenti in età precoce, indagando sia i cambiamenti percettivo-comportamentali sia le modificazioni su un piano neuroradiologico.

Il progetto di ricerca è caratterizzato da due fasi di lavoro:

- 1) Nella prima fase, le attività sono state orientate principalmente alla definizione del tipo di stimolazione ottimale. Oggetto di indagine sono state le modalità di presentazione e la natura degli stimoli.
- 2) La seconda fase della ricerca sarà invece rivolta alla messa in atto e alla valutazione degli effetti del trattamento. La valutazione dell'efficacia sarà basata non soltanto su dati clinici e modificazioni comportamentali, ma anche su dati di neuroimmagine. Entrambi i gruppi saranno valutati in due momenti diversi con le medesime indagini cliniche, comportamentali e neuroradiologiche: il gruppo A prima (Tempo1) e dopo il trattamento (Tempo2), il gruppo B alla medesima distanza temporale intercorsa tra il Tempo 1 e il Tempo 2. Il primo esame neuroradiologico verrà effettuato per entrambi i gruppi durante il periodo di degenza nel reparto di patologia neonatale.

Rispetto alla prima fase, la mancanza di precedenti studi approfonditi rispetto alle modalità di trattamento in bambini così piccoli ha reso necessaria una prima indagine riguardante la definizione di alcuni aspetti critici, quali il tipo di stimoli proposti, le modalità di presentazione e la fase di sviluppo più appropriata per il training. A questo proposito è stato messo a punto un protocollo basato sul paradigma dell'abituazione visiva e volto ad indagare la capacità di percezione intermodale in soggetti ipovedenti. I soggetti a cui si propone di rivolgere questo studio (gruppo 0) non saranno inclusi nel campione principale.

Il campione principale è costituito da bambini con diagnosi precoce di ipovisione, selezionati sulla base di criteri clinici di inclusione e suddivisi casualmente in due sottogruppi: gruppo A (di training) e gruppo B (di controllo). Il

gruppo A parteciperà ad un training di stimolazione visiva, mentre il gruppo B non usufruirà del trattamento. Il confronto tra questi due gruppi permetterà di osservare gli effetti del trattamento, ipotizzando che le modificazioni osservate nel gruppo A tra il Tempo 1 e il Tempo 2 non siano attribuibili all'evoluzione spontanea, ma riconducibili alla stimolazione proposta.

Risultati e prodotti conseguiti

Un primo obiettivo del presente studio è stato l'individuazione di un set di stimoli il più possibile efficace da proporre in un contesto riabilitativo. A questo scopo è stato progettato un protocollo di ricerca volto ad indagare le capacità di percezione intermodale (ovvero di informazioni che colpiscono contemporaneamente più canali sensoriali) in soggetti ipovedenti nei primi mesi di vita.

In particolare si è ritenuto utile indagare la capacità di discriminazione di due ritmi diversi, essendo il ritmo un'informazione amodale, che può essere percepita sia visivamente che uditivamente. Gli stimoli sono stati messi a punto prestando particolare attenzione alle loro caratteristiche percettive, in modo tale da ottimizzarne la detezione da parte di soggetti ipovedenti. Sono state affrontate alcune questioni riguardanti i colori dello stimolo da presentare, la forma e la dimensione. A questo scopo sono state svolte alcune osservazioni comportamentali di bambini ricoverati nella Unità Operativa di Neuroriabilitazione del nostro Istituto, al fine di valutare le diverse reazioni di fronte agli stimoli proposti.

Sulla base di queste considerazioni si è scelto di utilizzare uno stimolo audiovisivo raffigurante una palla che rimbalza ad un determinato ritmo. Al fine di aumentare il livello di contrasto e facilitare la visione dello stimolo, si è deciso di utilizzare stimoli in bianco e nero. E' stato controllato anche lo spostamento nello spazio della palla: al fine di facilitare l'inseguimento dello stimolo si è pensato di far rimbalzare la palla lungo un piano orizzontale e contro due pareti verticali laterali e con uno spostamento laterale di circa 20° di angolo visivo. Si è scelto un movimento ritmico, sufficientemente lento per poter essere facilmente seguito.

Per quanto riguarda il soggetto, una palla è sembrata lo stimolo ottimale sia per il livello non eccessivo di complessità (in modo tale da favorire i bambini del gruppo sperimentale), sia per il grado di interesse (in modo tale da risultare interessante anche per il gruppo di controllo).

Al fine di risolvere alcune delle questioni riguardanti la scelta degli stimoli sono state effettuate delle prove di stimolazione, coinvolgendo alcuni bambini ricoverati nella Unità Operativa del nostro Istituto. Tutte le prove sono state videoregistrate, previo consenso informato dei genitori. Particolare attenzio-

ne è stata prestata riguardo al setting, in particolare riguardo alla posizione del bambino, alla sua distanza dagli stimoli e alle condizioni di illuminazione della stanza.

Sono state avviate anche le pratiche di reclutamento dei soggetti.

Attività previste

Nel corso della RC 2010 è previsto l'avvio delle videoregistrazioni riguardanti il protocollo volto a valutare la percezione intermodale in soggetti ipovedenti. Il campione sarà costituito da tre sottogruppi: un primo sottogruppo sarà costituito da bambini con diagnosi di ipovisione, un secondo sottogruppo comprenderà invece bambini con diagnosi di ritardo psicomotorio, mentre un terzo sottogruppo riguarderà bambini a sviluppo tipico. Nel corso del 2010 si ritiene di reclutare 15 bambini per gruppo, per un totale di 45 osservazioni. Tutti i soggetti parteciperanno a 3 sessioni sperimentali, ciascuna della durata di circa 10 minuti, preferibilmente effettuate nella stessa giornata a distanza di circa 15 minuti l'una dall'altra, per una durata totale di circa un'ora. Le tre sessioni comprenderanno:

- presentazione audiovisiva di un RITMO 1 (abituazione) + presentazione solo visiva di un RITMO 1 e un RITMO2 (fase test) in successione.
- presentazione visiva di un RITMO 1 (abituazione) + presentazione solo visiva di un RITMO 1 e un RITMO2 (fase test) in successione
- presentazione acustica di un RITMO 1 (abituazione) + presentazione solo acustica di un RITMO 1 e un RITMO2 (fase test) in successione.

L'ordine delle tre sessioni verrà bilanciato tra i soggetti.

Nel corso del 2010 si prevede inoltre di continuare l'indagine rispetto alle modalità di stimolazione utilizzabili in un contesto di riabilitazione. Verrà inoltre costruito il protocollo di riabilitazione, la cui efficacia sarà valutata in un secondo momento.

ATASSIE CONGENITE NON EVOLUTIVE: STUDIO CLINICO, GENETICO E NEURORADIOLOGICO

DR. RENATO BORGATTI

E-MAIL: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 10
Neuroimaging

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Bosisio Parini

Collaborazioni

Istituto C.S.S. Mendel - Roma (Prof.ssa E.M. Valente)

DESCRIZIONE

L'utilizzo sempre più ampio della risonanza magnetica (RMN) dell'encefalo in soggetti con problemi neurologici e la messa a punto di tecnologie sempre più avanzate, ha incrementato in modo considerevole la conoscenza dei quadri malformativi coinvolgenti il Sistema Nervoso Centrale, permettendo la messa a punto di protocolli neuroradiologici specifici (Jissendi P et al 2008) (Barkovich AJ et al 2009). Parallelamente, uno studio sempre più dettagliato delle abilità cognitive e neuropsicologiche oltrechè della descrizione di diversi fenotipi comportamentali ha portato ad una miglior comprensione della relazione sussistente tra le lesioni riscontrabili all'indagine neuroradiologica ed i profili cognitivi comportamentali osservati nei pazienti (Tavano A et al 2007). I progressi nel campo dell'indagine genetica consentono oggi di ritrovare sempre più frequentemente alla base dei quadri malformativi cerebrali, situazioni di sbilancio cromosomico o, più raramente, mutazioni puntiformi di singolo gene (Wong G et al 2010), con il risultato che la correlazione genotipo-fenotipo è sempre più frequente e precisa.

La ricerca si è proposta l'obiettivo di rivalutare un'ampia casistica di soggetti con atassia congenita non evolutiva e malformazioni cerebellari, individuati sulla base del quadro clinico e del reperto neuroradiologico, al fine di raccogliere dati preliminari relativi a:

- correlazione genotipo-fenotipo
- ampliare le conoscenze in ambito genetico (possibilità di trovare nuovi loci/nuovi geni candidati)
- studio del ruolo di specifici geni potenzialmente coinvolti nella eziopatogenesi di determinate malformazioni cerebellari (e quindi ruolo degli stessi geni

nella morfogenesi del cervelletto e della fossa cranica posteriore)
- una caratterizzazione di quadri omogenei dal punto di vista clinico e neuroradiologico, con uno specifico profilo cognitivo-comportamentale, e assetto genetico al fine di individuare possibili iter diagnostici e riabilitativi mirati e specifici.

Risultati e prodotti conseguiti

Nel primo anno della ricerca sono stati arruolati 34 soggetti con atassia congenita non evolutiva, 16 maschi e 18 femmine, di età compresa tra i 2 anni e 9 mesi e i 30 anni e 2 mesi.

Per ogni soggetto è stato ottenuto un consenso informato da entrambi i genitori. È stato inoltre compilato un questionario clinico specifico per "malformazioni cerebellari congenite" e per "JSRD" a seconda della condizione clinica presentata. È stato inoltre acquisito materiale fotografico del paziente. Per ogni soggetto è stato inoltre prelevato un campione di sangue (circa 8 cc di sangue in eparina e in EDTA) per le indagini genetiche previste.

Ogni soggetto è stato sottoposto a: un'attenta raccolta anamnestica familiare (presenza di familiari con: stesso quadro clinico, quadro plurimalformativo, poliabortività, mortalità in epoca perinatale, etc..) e gravidica (ricerca teratogeni o eventi infettivi materni), ad una valutazione clinica /dismorfologica e neuropsichiatrica, ad indagini strumentali varie (es. ecocardiogramma, ecografia addome completo, indagini radiologiche apparato scheletrico, registrazione EEG, etc..) ed altre valutazioni specialistiche (es. in ambito oculistico ed audiologico), in casi selezionati. È stata inoltre condotta una rivalutazione delle indagini neuroradiologiche precedentemente effettuate attraverso un protocollo appositamente elaborato per lo studio della struttura della fossa cranica posteriore. Sulla base del reperto neuroradiologico riscontrato, sono state avviate indagini genetiche di II° livello (analisi del genoma con la metodica SNP-array o ricerca di mutazioni in geni specifici). I pazienti per i quali resta al momento dubbia l'interpretazione del dato neuroradiologico (es. ipoplasia cerebellare non evolutiva vs atrofia cerebellare progressiva), non stati avviati a studi genetici, ma sono in attesa di ulteriore valutazione clinica e neuroradiologica.

In relazione al fenotipo neuroradiologico, specifici sottogruppi di soggetti sono stati sottoposti ad analisi di mutazione in geni candidati, identificati sulla base dei dati presenti in letteratura:

- malformazione di Dandy-Walker: geni ZIC 1, ZIC 4 e FOXC1
- ipoplasia cerebellare in maschi con ritardo mentale: OPHN1 e CASK
- malformazione del Dente Molare (MTS) in Joubert Syndrome and Related Disorders (JSRD): INPP5E, AHI1, NPHP1, CEP290, MKS3, RPGRIP1L,

ARL13B, CC2D2A, Locus 11p12-q13.

I soggetti non appartenenti alle categorie specifiche sopraelencate o negativi all'analisi molecolare, sono stati candidati ad analisi del genoma con la metodica SNP-array Affimetrix.

I 34 soggetti arruolati nello studio, in base al reperto neuroradiologico, sono stati suddivisi in tre sottogruppi: anomalie cerebellari primarie isolate (22 soggetti); associate ad altre anomalie sottotentoriali (un soggetto) o a malformazioni sovratentoriali (12 soggetti).

Dall'analisi dei dati preliminari emerge quanto segue: nessun soggetto arruolato presentava agenesia cerebellare, atrofia cerebellare progressiva, ipoplasia ponto-cerebellare, tegmental cap dysplasia, malformazione di Dandy-Walker, o schisi-disgenesia emisferica unilaterale. Dei soggetti con diagnosi neuroradiologica di malformazione del Dente Molare (Sindrome di Joubert) (8/34), uno (1/8) presentava anomalia sovratentoriale associata (malformazione dello sviluppo corticale).

Dei soggetti con malformazione di Arnold Chiari (8/34), uno (1/8) presentava dilatazione ventricolare associata. L'ipoplasia isolata del verme (4/34) si associava in un caso sia ad anomalie sottotentoriali (lieve ipoplasia del ponte), sia ad anomalie sovratentoriali (delle strutture commessurali), mentre in un caso era associata unicamente ad anomalie delle strutture commessurali. L'ipoplasia cerebellare globale (10/34) era associata unicamente ad anomalie sovratentoriali (5/10): in tre casi (3/10) a malformazioni dello sviluppo corticale, in un caso (1/10) ad anomalie delle strutture commessurali; in un caso (1/10) sia a malformazioni dello sviluppo corticale che delle strutture commessurali. Il caso di romboencefalosinapsi (1/34) era associato ad anomalia sovratentoriale (ampliamento bilaterale dell'acquedotto vestibolare). Il caso di displasia cerebellare era associato a malformazione dello sviluppo corticale e ad anomalia delle strutture commessurali. Dei due casi classificati come shrunken cerebellum, uno era associato a malformazione dello sviluppo corticale.

Dati interessanti in ambito molecolare e citogenetico sono stati sinora:

- il riscontro di mutazione puntiforme in omozigosi (H896R) in un fratello e un sorella di 8 ½ anni e 4 ½ anni rispettivamente, con quadro di sindrome di Joubert, caratterizzato da: segno radiologico del "Dente molare" e grave ritardo neuropsichico che interessa le diverse competenze neuro e psicomotorie, cognitive e linguistiche, e neurovisive. Il fenotipo individuato è parzialmente compatibile con quanto descritto in letteratura. Infatti è assente il dato, descritto nel 12.7% dei soggetti con mutazione nota di AHI1, di associazione con anomalia di migrazione neuronale, e retinopatia (progressivo nel 21.7 % dei soggetti).

- il riscontro di riarrangiamento cromosomico (del 3q22-3q25), in una bam-

bina di 2 anni e 2 mesi, che presenta un quadro clinico caratterizzato da ipoplasia cerebellare (prevalente a carico del verme), microcefalia, ritardo neuropsicomotorio, ipotonia muscolare generalizzata normorefflessica.

I risultati della presente attività di ricerca corrente sono stati inoltre oggetto delle seguenti pubblicazioni su riviste internazionali

Tavano A., Borgatti R. Evidence for a link among cognition, language and emotion in cerebellar malformations. *Cortex* 2009. 16 Sept [E Pub]

Travaglini L., Brancati F., Attie-Bitach T. Borgatti R., et al. Expanding CEP290 mutational spectrum in ciliopathies. *Am J Med Genet A*. 2009 Oct; 149 A(10): 2173-80

Tavano A., Borgatti R. The role of cerebellar structures in communication and language disorders. In *Localization of brain lesions and developmental functions*, Riva D. and Njiokiktjien C. editors. 2010 John Libbey Eurotext.

Attività previste

Nel corso del 2010 verrà ampliato ulteriormente il campione di pazienti oggetto di studio, mediante il reclutamento di tutti i soggetti che afferiscono al nostro Istituto, con atassia non evolutiva e malformazioni cerebellari, individuati sulla base del quadro clinico e del reperto neuroradiologico.

Verrà ampliata e completata l'analisi genetica sia di tipo molecolare (per specifici sottogruppi di soggetti, sulla scorta dei dati della letteratura e di un quadro malformativo comune), sia di tipo citogenetico (analisi del genoma con la metodica per la genotipizzazione Affymetrix polimorfismo a singolo nucleotide SNP-array Affimetrix) in soggetti negativi all'analisi molecolare o non appartenenti a specifiche categorie.

Verrà approfondito e completato lo studio neuroradiologico, attraverso lo specifico protocollo elaborato per lo studio della struttura della fossa cranica posteriore, anche attraverso l'utilizzo di RM ad alta risoluzione spaziale (3 Tesla con bobina 32 canali). Particolare attenzione

1) al gruppo di pazienti definiti "shrunken cerebellum" che comprende tutti quei casi con cervelletto dall'apparenza prevalentemente atrofica e allargamento degli spazi tra i folia, in cui non è disponibile il dato clinico o neuroradiologico di progressione nel tempo. Questa categoria verrà pertanto riesaminata in base ai dati di follow-up, per giungere alla corretta diagnosi di forma malformativa (ipoplasia) o degenerativa (atrofia) e pertanto accedere alla corretta indagine genetica;

2) ai pazienti con Sindrome di Joubert e condizioni correlate, che a fronte di un'ampia variabilità fenotipica ed eterogeneità genetica, sono accumulate da un unico fenotipo neuropatologico, rappresentato, all'indagine neuro-radiologica, dal "segno del dente molare". Una migliore comprensione del problema, del ruolo giocato dal cervelletto e dalle strutture ponto-mesencefaliche nel controllo di queste funzioni, sarà possibile solo attraverso studi che, dopo aver approfondito il più possibile le differenze neuroanatomiche presenti nelle diverse JSRDs, le correlino con i differenti profili cognitivo-linguistici e pattern neuromotori riscontrabili.

STUDIO DI NEUROIMAGING AVANZATO (VOLUMETRIA, TRATTOGRAFIA, SPETTROSCOPIA, RMN) IN SOGGETTI CON MALATTIA DEL 1° MOTONEURONE MOLECOLARMENTE DEFINITE

DR. ANDREA MARTINUZZI

E-MAIL: ANDREA.MARTINUZZI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 10
Neuroimaging

Periodo di svolgimento
2010

Tipo di ricerca
Corrente

Polo scientifico
Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

Altre strutture dell'IRCCS Medea: UO RF Polo Bosisio Parini
Istituto di Fisiologia Clinica del CNR - CREAS di Pisa

DESCRIZIONE

Esiste un'unica pubblicazione che dettaglia aspetti di analisi MRI volumetriche in un ristretto numero di soggetti con HSP. Non sono disponibili studi volumetrici accurati, di DTI con ricostruzione trattografica e di analisi spettroscopica mirata in queste forme di neurodegenerazione sistematica selettiva caratterizzate da apparente sovrapposizione fenotipica e da ampia eterogeneità genotipica.

In particolare mancano del tutto dati relativi alle modificazioni a livello spinale rilevabili in queste forme di danno cortico-spinale progressivo degenerativo. In relazione alle competenze cognitive deficitarie nei soggetti affetti da malattia del primo motoneurone (sia in forma di deficit cognitivi congeniti sia in forma di decadimento cognitivo dell'età adulta) è interessante valutare le possibili correlazioni neuroradiologiche e metaboliche nei diversi gruppi di patologie definite geneticamente.

Fino da ora i dati presenti in letteratura evidenziano deficit cognitivi specifici (deficit funzioni esecutive o demenza sottocorticale) ad esempio in famiglie con mutazione SPG4 ma senza un correlato neuroradiologico, così come recenti lavori sottolineano alterazioni del metabolismo a livello dei nuclei della base in piccoli gruppi di pazienti affetti da paraparesi spastica legata a mutazioni gene SPG11, senza ipotesi clinico-funzionali dettagliate.

Grazie a progetti di ricerca precedentemente attivati (Ricerca Finalizzata 2006) presso questo Polo con la collaborazione del Polo di Bosisio, è già stata raccolta e ordinata una cospicua casistica di soggetti affetti da paraparesi

spastica familiare (357 pazienti), per molti dei quali è già stata determinata la etiologia molecolare:

- SPG4 molecolarmente definiti 33
- SPG7 molecolarmente definiti 5
- SPG10 molecolarmente definita 1
- SPG3 molecolarmente definita 1
- SPG17 Molecolarmente definita 1
- SPG 15 molecolarmente definiti 3
- SPG11 molecolarmente definiti 11

Accanto a questa casistica, sempre nell'ambito di un'altra ricerca finalizzata ministeriale avviata nel corso del 2008, si sta accumulando una crescente casistica di soggetti con forme giovanili di amiotrofia spinale e sclerosi primaria giovanile legate a mutazioni di ALS2, Senataxina, Aprataxina.

L'acquisizione di nuove conoscenze in ambito di neuroimaging avanzato in questo gruppo di patologie rappresenta quindi una novità assoluta.

La ricerca si pone in continuità rispetto al progetto di RC2009 con analogo titolo, sviluppando le acquisizioni di imaging e sistematizzando i dati clinici (fenotipo) ordinati per diagnosi molecolare (genotipo).

Obiettivi

- Descrivere le caratteristiche fenotipiche in termini di neuroimaging in HSP e JPLS molecolarmente definite
- Correlare le predette caratteristiche con il genotipo
- Definire un algoritmo di studio di neuroimaging avanzato in grado di fornire per queste forme di neuro degenerazione rara elementi di orientamento diagnostico e prognostico.

Risultati e prodotti conseguiti

Sistematizzazione del database pazienti

È stato creato un database riassuntivo di tutte le valutazioni completate sui pazienti afferenti ai Centri.

L'analisi iniziale ha riguardato 28 soggetti con diagnosi di HSP. Per 16 di questi è disponibile la definizione diagnostica molecolare: 9 SPG4, 2 dei quali portatori anche di una mutazione SPG7 in eterozigosi, 5 SPG3a (1 famiglia), 1 SPG5, 1 SPG10.

Accanto al gruppo HSP, lo studio ha interessato anche 3 nuclei familiari (5 soggetti affetti) con diagnosi clinica di JPLS. La definizione diagnostica ha rivelato mutazioni dei geni per Alsina (1 soggetto), Senataxina (2 soggetti), e Aprataxina (2 soggetti).

Definizione del fenotipo clinico dei pazienti con HSP

Gli strumenti clinici di definizione del fenotipo sono stati i seguenti:

- Scheda clinica HSP
- Paraplegia rating scale
- Protocollo cognitivo (WAIS-R o WISC-R, WECHSLER MEMORY SCALE, FIGURA di REY (copy e memory), FLUENZA VERBALE
- Misura di QoL: SF36 (soggetti >16 aa)
- Misura di disabilità: WHO DAS- 2 (soggetti >18 aa)

L'analisi dei dati clinici si è concentrata innanzitutto sui soggetti con diagnosi molecolare.

Non sono stati riscontrati deficit cognitivi rilevanti. Il quadro clinico prevalente è di HSP pura (tutti i soggetti con diagnosi di SPG4, il soggetto con SPG5 e SPG10). Nel pedigree con diagnosi di SPG3a si rileva la comparsa in fase tardiva (3° decade) di atrofia distale. Le misure di QoL evidenziano un buon adattamento al deficit funzionale nelle aree non direttamente connesse alla motilità.

Per il gruppo dei soggetti con JPLS il quadro clinico appare di tetraplegia spastica ascendente con cognizione indenne per il primo soggetto con mutazioni in Alsina, e di sindrome mista atasso spastica progressiva per i secondi, con rilevante coinvolgimento cognitivo.

Messa a punto del protocollo di valutazione in RMN.

In collaborazione con l'UO di immagini dell'ULS 7, presso cui è ubicata la RMN utilizzata nel corso di quest'anno, grazie all'input dello specialist della Philips chiamato a rispondere di alcuni aspetti problematici sul piano tecnico, e con il consulente Neuroradiologo del CNR, è stato definito il protocollo di acquisizione da applicare ai soggetti con HSP molecolarmente definita e ai controlli. Le acquisizioni permettono

- una analisi morfometrica di ROI rilevanti nella patologia in oggetto (peduncoli cerebrali, capsula interna, corteccia prerolandica)
- una ricostruzione di fiber tracking del sistema cortico-spinale
- una analisi spettroscopica della area prerolandica del vertice

Il tentativo di acquisire gli stessi parametri sul volume del midollo cervicale non ha dato origine a dati leggibili, e di conseguenza dopo alcuni tentativi è stato abbandonato ogni tentativo con l'apparecchiatura a disposizione. Un tentativo su soggetti di controllo con il magnete a disposizione presso il CNR a Pisa (3T Siemens) ha invece dimostrato la fattibilità dell'imaging avanzato a tale livello.

Attualmente essendo a disposizione la RNM3T a Bosisio, si ritiene a maggior

ragione fattibile quanto proposto.

Inizio delle acquisizioni su pazienti e controlli

Sono state acquisite registrazioni RMN complete (morfometria, DTI, spettroscopia) per encefalo su 7 soggetti con diagnosi molecolare di SPG4 e su 12 soggetti controllo di età comparabile.

Analisi dei dati acquisiti

La valutazione iniziale ha dimostrato una buona qualità dei dati acquisiti sull'encefalo. Le valutazioni comparative tra soggetti di controllo e soggetti mutati è in corso.

Attività previste

Agli 11 soggetti con diagnosi molecolare definita di HSP da mutazioni in SPG4 studiati nel corso del 2009, si aggiungeranno i seguenti soggetti:

altri 4 soggetti con mutazioni SPG4

5 soggetti con mutazioni SPG3a

1 soggetto con mutazione SPG11

1 soggetto ciascuno con diagnosi di ALS2, 4, e 8.

I soggetti verranno studiati presso la UO di neuroradiologia dell'OC di Conegliano utilizzando un apparecchio Philips Achieva 1.5T espandibile a 3T, o presso la neuroradiologia di Bosisio- Ospedale San Raffaele, Milano (3 T) in relazione alla loro residenza.

Le impostazioni di acquisizione e i paradigmi di analisi per le acquisizioni con l'apparecchiatura a 1,5T sono state messe a punto nel corso del 2009, e verranno applicate in questa fase.

Per le acquisizioni di spettroscopia del midollo cervicale, verificata la scarsa qualità dei dati ottenibili con l'apparecchiatura disponibile a Conegliano, in attesa di poter testare quella di Bosisio, verrà utilizzato il magnete disponibile a Pisa con la collaborazione dell'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR.-CREAS di Pisa.

In particolare, viste le precedenti esperienze descritte in letteratura, e i dati preliminari ottenuti nel 2009, verranno studiati:

- i dati volumetrici di sezioni significative (piramidi bulbari, fasci laterali spinali, braccia posteriori capsula interna, corteccia pre-rolandica)
- i dati spettroscopici di voxel identificati nell'ambito delle precedenti aree cerebrali
- i dati qualitativi emergenti dalla elaborazione di immagini DTI per la ricostruzione delle vie motorie in trattografia.

Le informazioni ottenute con lo studio di imaging verranno confrontate con i dati genetici e clinici.

Per la raccolta dei dati funzionali e clinici verranno utilizzati i protocolli già messi a punto e verificati. In particolare:

- Scheda clinica HSP
- Paraplegia rating scale
- Protocollo cognitivo (WAIS-R o WISC-R, WECHSLER MEMORY SCALE, FIGURA di REY (copy e memory), FLUENZA VERBALE. Ev Mini Mental (per pazienti più decaduti, adulti)
- Misura di QoL: SF36 (soggetti >16 aa)
- Misura di disabilità: WHO DAS- 2 (soggetti >18 aa)

Analisi dei dati

Correlazione tra dato genetico e Profilo di imaging

Il profilo di imaging emergente dalle acquisizioni dei soggetti con mutazioni nei diversi geni verrà aggregato cercando di identificare elementi costanti caratteristici dello specifico locus implicato, a fronte invece di elementi condivisi da più loci.

Correlazione imaging/fenotipo

Nell'ambito dei gruppi di pazienti con mutazioni nello stesso locus, verrà studiata la correlazione tra elementi discreti emergenti dai profili funzionali (punteggio SPSR, punteggi scale cognitive, punteggi nei diversi domini delle misure di QoL e disabilità) e i dati emergenti dagli studi di imaging, alla ricerca di elementi strutturali o metabolici predittivi per specifiche alterazioni funzionali clinicamente rilevanti.

RICERCHE MINISTERIALI FINALIZZATE 2008

RAZIONALI

VALUTAZIONE DI ELEMENTI PROGNOSTICI NEL RISVEGLIO DAL COMA ATTRAVERSO TECNICHE COMBinate DI RMN, FRMN, STUDIO POLISONNOGRAFICO E TECNICA FNIRS (FUNCTIONAL NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY)

DR.SSA SANDRA STRAZZER

E-MAIL: SANDRA.STRAZZER@BP.LNF.IT

Linea di ricerca n. 2

Riabilitazione Neuromotoria e
Neuropsicologia Funzionale

Periodo di svolgimento

26.07.2010 - 25.07.2012

Tipo di ricerca

Finalizzata

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Unità Operative e collaborazioni

U.O. 1: Brain Injury Rehabilitation Unit - IRCCS "E. Medea" di Bosisio P. (Lc)
U.O. 2: Neuroimaging Research Unit (NIRU) - IRCCS "E. Medea" di Bosisio P. (Lc)
U.O. 3: Neuroimaging Research Unit - San Raffaele Scientific Institute and University

DESCRIZIONE

Obiettivo principale ed eventuali obiettivi secondari del progetto

Ogni anno nella nostra Unità (Gravi Cerebrolesioni Acquisite) sono ricoverati circa 20-25 bambini e giovani in SV per traumi cranici, anossie cerebrali, encefaliti, stroke emorragici, tumore cerebrale. Solo pochi evolvono in maniera veloce verso una ripresa della coscienza, per la maggior parte il processo è lento e richiede mesi, in alcuni casi più di un anno. Circa il 10- 20% dei pazienti totali permangono in SV o in uno stato definito di MCS.

La diagnosi e lo studio dello SV e di MCS si basano al momento solo sulla osservazione clinica.

Bisogna sapere che è ritenuto molto alto l'errore diagnostico, ovvero pazienti definiti in SV che in realtà presentano quadri di MCS, di locked-in syndrom o di disabilità estrema. Tale errore è gravissimo se si considera che in queste ultime condizioni è presente uno stato di coscienza. Sarebbero pertanto utili approfondite indagini strumentali di imaging e di neurofisiologia clinica dirette a definire e a meglio chiarire le condizioni funzionali cerebrali, valutare l'integrità delle vie sensitivo-sensoriali e la presenza di eventuali processi discriminativi delle informazioni.

La diagnosi corretta è il primo dovere dei clinici nel rispetto della persona soprattutto per quelle condizioni drammatiche in cui la condizione clinica di SV

o di MCS si protrae indefinitamente per evitare sia l'abbandono assistenziale che l'accanimento terapeutico.

L'analisi comparata dei dati clinici e degli esiti degli esami strumentali è in grado di fornire elementi utili al fine di stabilire alcuni criteri prognostici in ordine all'evoluzione clinica di questi pazienti. Sarà importante definire anche il limite che i clinici hanno nella diagnosi di questi quadri neurologici così complessi.

In questo studio vogliamo comparare scale cliniche di definizione del quadro funzionale del soggetto dei giovani pazienti con disturbi di coscienza con dati di:

- Neuro-Imaging: studio morfologico ad alta risoluzione del cervello mediante RM 3T e bobina dell'encefalo a 32 canali.
- Neuro-Imaging funzionale: studio del cervello sia in condizioni di "resting state" che dinamico, durante particolari stimolazioni motorie, sensoriali attraverso fRNM, fNIRS.
- Neurofisiologia: studio dell'attività elettrica cerebrale spontanea attraverso l'utilizzo della polisonnografia.

L'obiettivo principale è la valutazione se l'analisi comparata dei dati clinici e degli esiti degli esami strumentali è in grado di fornire elementi utili al fine di stabilire alcuni criteri prognostici in ordine all'evoluzione clinica di questi pazienti.

Gli obiettivi secondari sono:

- 1) definire e chiarire le condizioni funzionali cerebrali, valutare l'integrità delle vie sensitivo-sensoriali e la presenza di eventuali processi discriminativi delle informazioni
- 2) comparazione delle varie metodiche per vedere quali siano le più significative e predittive, eventualmente stabilendo una scala di utilizzo delle stesse.

Precedenti conoscenze disponibili

Nei paesi industrializzati le Gravi Cerebrolesioni Acquisite (GCA) colpiscono un numero sempre maggiore di persone con un trend in continua crescita. L'Italia si colloca ai primi posti nel mondo relativamente al peso di queste patologie. Una grave e diffusa lesione del Sistema Nervoso Centrale determina gravi alterazioni dello stato di coscienza fino allo stato di coma. I quadri clinici residuali possono assumere diversi livelli di gravità, nel 1972, Bryan Jennet e Freed Plum hanno definito i parametri clinici dello stato vegetativo (SV): completa perdita della coscienza di sé e della consapevolezza dell'ambiente; recupero della ciclicità del ritmo sonno-veglia; conservazione più o meno completa delle funzioni ipotalamiche e troncoencefaliche autonome. Nel 2002 la Aspen Neurobehavioral Conference Workgroup ha riconosciuto che

la realtà clinica relativa ai pazienti con esiti di grave danno cerebrale acquisito è più complessa ed ha definito lo stato di minima coscienza o Minimally Conscious State (MCS) quale evoluzione favorevole dello SV. In tali soggetti si può infatti osservare la presenza, benché minima, di comportamenti caratterizzati da risposte o manifestazioni cognitive che, sebbene incostanti, sono riproducibili e di una tale durata da differenziarli dai comportamenti riflessi.

La diagnosi e lo studio dello stato vegetativo e di minima coscienza si basano al momento solo sulla

osservazione clinica. Owen nel 2007 ha dimostrato la presenza di aree di processamento corticale delle informazioni uditive/linguistiche in 3 pazienti su 7 che avevano una diagnosi di SV.

Reference

Jennett B, Plum F. Persistent vegetative state after brain damage. A syndrome in search of a name. *Lancet* 1972 Apr 1;1(7753):734-7.

The minimally conscious state: definition and diagnostic criteria. Giacino JT, Ashwal S, Childs N, Cranford R, Jennett B, Katz DI, Kelly JP, Rosenberg JH, Whyte J, Zafonte RD, Zasler ND. *Neurology*, 2002 Feb 12;58(3):349-53

Coleman MR, Rodd JM, Davis MH, Johnsrude IS, Menon DK, Pickard JD, Owen AM. Do vegetative patients retain aspects of language comprehension? Evidence from fMRI. *Brain* 2007 Oct;130(Pt 10):2494-507

Owen AM, Coleman MR. Detecting awareness in the vegetative state. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1129:130-8

Nuove informazioni che il progetto renderà disponibili

Il progetto prevede di utilizzare più strumenti in grado di fornire informazioni differenti ma complementari riguardo alla presenza di processi di attivazione cerebrale in condizioni cliniche quali quelle di SV o di MCS. In particolare la Risonanza Magnetica Cerebrale Funzionale (fRMN) e la Functional Near Infrared Reflectance Spectroscopy (fNIRS), sono in grado di rilevare cambiamenti emodinamici conseguenti ad una attività cerebrale mentre la polisonnografia è in grado di registrare cambiamenti elettrici durante il sonno.

Tutti questi strumenti valutano, con modalità differente l'integrità delle vie sensitivo-sensoriali e la

presenza di eventuali processi discriminativi delle informazioni. L'analisi comparata dei dati clinici e degli esiti degli esami strumentali è in grado di fornire elementi utili al fine di stabilire alcuni criteri diagnostici/prognostici di

questi pazienti, attualmente assenti.

Obiettivi intermedi previsti

Data l'organizzazione del progetto, i risultati di ogni unità operativa e di ogni work package (WP) sarà disponibile dell'intero staff tutte le volte che questi arrivino e il database rifletterà l'avanzamento dei lavori. In questo modo le unità saranno informate sull'arruolamento dei pazienti, le loro caratteristiche cliniche, la modificazione del quadro funzionale in tempo reale e anche sul risultato degli esami strumentali. Anche le prime fasi del progetto (WP02 e WP03, vedi diagramma di Gantt) sono fortemente condivise e verrà prodotto insieme il protocollo con i criteri di inclusione e esclusione, il protocollo per monitorare l'evoluzione clinica dei pazienti, da queste scelte sarà prodotto il database che sarà la piattaforma comune su cui lavorare. Le successive WP04, WP05, WP06 procederanno obbligatoriamente in modo sincrono.

Metodologia

Coordinamento

Il coordinamento e il management del progetto hanno l'obiettivo di integrare i differenti approcci e coordinare l'attività di ricerca dei partecipanti. Il database sarà lo strumento per monitorare la progressione del progetto.

Definizione del Protocollo

L'obiettivo della definizione del protocollo è condividere tra le varie unità i criteri di inclusione ed esclusione dei pazienti. Decidere insieme gli indicatori di modificazione del quadro clinico rilevanti da confrontare con i dati strumentali. Definire le variabili cliniche e strumentali da raccogliere e riportare nel database.

Pazienti e valutazioni cliniche

Saranno arruolati tutti i pazienti in stato di coma, o stato vegetativo o di minima responsività ricoverati nell'Unità Operativa per le Gravi Cerebrolesioni Acquisite dell'IRCCS E.Medea dopo adeguato consenso informato dei genitori/tutori.

Saranno inclusi tutti i pazienti al primo ingresso presso la nostra struttura e tutti i pazienti che tornano per un follow-up con un'età compresa fra 4 e 18 anni, eseguiranno valutazioni cliniche standardizzate Glasgow Coma Scale e Coma Near Coma Scale, LOCFAS, sia all'ingresso che in modo sistematico ad ogni cambiamento clinico o al momento dell'esecuzione degli esami funzionali. Tale scale sono anche gli indicatori clinici per monitorare l'evoluzione del paziente. Venti pazienti dovranno avere una compromissione dello stato

di coscienza di esordio recente (Gruppo 1), mentre 20 pazienti saranno in uno stato cronico della malattia (oltre un anno) (Gruppo 2).

Esami strumentali

I pazienti sono sottoposti a diversi studi polisonnografici. Per i pazienti in fase sub-acuta l'esame verrà eseguito al loro ingresso, dopo 1 e 4 mesi, per i pazienti con uno stato vegetativo persistente l'esame verrà eseguito 1 sola volta. La registrazione avverrà durante le ore notturne mediante polisonnografo stanziale. A tutti i pazienti è applicato un montaggio comprendente 6 canali per la registrazione EEG (FP1, FP2, C3, C4, O1, O2) oculogramma (ROC, LOC), EMG submentale, EMG arto, e canali per il monitoraggio cardiorespiratorio (EKG, termistore, cannula nasale o cannula per flusso da tramite tracheostomica, cintura toracica e addominale, saturimetro). Sarà analizzata la macrostruttura del sonno e la presenza di alterazioni del ritmo cardiaco e delle frequenza respiratoria (apnee centrali o ostruttive, particolari patterns respiratori).

RM encefalo studio morfologico ad alta risoluzione

Per valutare la rima corticale con la più alta risoluzione spaziale possibile, verrà utilizzato un protocollo RM dedicato ad alta risoluzione spaziale.

I pazienti verranno sottoposti a RM dell'encefalo con scanner a 3 Tesla e nuova bobina della testa a 32 canali di ricezione, sviluppata recentemente da Philips Medical Imaging.

Verranno utilizzate sequenze 3D e 2D pesate in T2 con risoluzione spaziale planare compresa tra 220 e 250 micron spessore di sezione 1mm.

Verranno inoltre acquisite immagini 3D fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) con voxel pari a 1x1x1mm e 3D pesate in T1 (MPRAGE) con voxel pari a 1x1x1mm.

Per ottenere misure quantitative del parametro T2 del parenchima cerebrale verranno calcolate mappe assiali T2 utilizzando una sequenza spin echo pesata in T2 a 8 echi (20-240 ms).

Verranno inoltre eseguite acquisizioni DTI tradizionali con gradienti applicati in 35 direzioni e saranno testate acquisizioni "high angular resolution diffusion imaging" (HARDI) a maggior numero di direzioni e con valore di b maggiore di 1000.

La geometria (campo di vista) e lo spessore di tutti i volumi di acquisizione saranno mantenuti uguali in tutte le sequenze in modo tale da consentire una migliore coregistrazione sia tra loro che con i dati di fMRI e trattografia (DTI- fiber tracking). L'orientamento delle acquisizioni seguirà il piano della commessura antero-posteriore (linea AC-PC).

I dati morfologici ottenuti saranno coregistrati con quelli ottenuti nell'analisi funzionale (fMRI) e di fiber tracking.

RMN funzionale

In tutti i pazienti verranno acquisito un esame fMRI basale, nei pazienti del Gruppo 1 ci sarà una seconda valutazione fMRI dopo un periodo di riabilitazione intensiva.

Utilizzando un magnete 3.0 Tesla Philips Intera, verranno acquisite le seguenti sequenze:

- 1) sequenza fast field echo pesata in T1 3D ad alta risoluzione;
- 2) fMRI: sequenza single-shot echo-planar imaging (EPI) pesata in T2*. Durante l'acquisizione fMRI, verranno utilizzati i seguenti paradigmi:
 - fMRI RS: i pazienti indosseranno una maschera sugli occhi. Non verranno somministrati stimoli visivi, uditivi, né somatosensoriali;
 - Stimolazione uditiva: verrà utilizzato un approccio gerarchico, come suggerito da Owen et al., (2006) e Coleman et al. (2007). Nel dettaglio, utilizzando un paradigma evento-correlato a sei condizioni, verranno testate le risposte uditive di basso livello, le capacità di elaborazione delle percezioni linguistiche di medio livello, e gli aspetti semantici di alto livello dell'elaborazione linguistica. Centocinquanta stimoli uditivi preregistrati verranno presentati in maniera binaurale in ordine pseudorandom. Verranno presentate 30 parole raggruppate per numero di sillabe e concretezza, e 30 parole prive di senso ma morfologicamente plausibili di durata e articolazione comparabili. Allo stesso modo, verranno costruite 30 frasi di senso compiuto e struttura sintattica definita (soggetto-verbo transitivo-complemento oggetto) e accoppiate a 30 frasi senza senso con lo stesso numero di parole e la stessa struttura sintattica. Trenta Stimoli rumorosi segnale-correlati saranno generati manipolando digitalmente parole e segmenti di frasi in modo da renderli completamente incomprensibili. Inoltre, sarà inclusa una sessione basale di silenzio. Per minimizzare l'interferenza del rumore del magnete verrà utilizzata una tecnica di imaging "sparse".
 - Stimolazione visiva: verrà utilizzato un compito di percezione di visi familiari (Owen et al., 2002) secondo un disegno a blocchi con tre condizioni alternate in ordine pseudorandom: a) "condizione familiare" (foto di parenti o amici del paziente), b) "condizione non familiare" (foto di persone sconosciute), c) "condizione di controllo" (foto sfuocate).
 - Stimolazione tattile: verrà effettuata una stimolazione tattile del palmo della mano destra (Agosta et al., 2008), utilizzando un disegno a blocchi nel quale sei periodi di attività saranno alternati a sei periodi di riposo, ciascun periodo della durata di cinque scansioni.

I pazienti devono eseguire parallelamente uno studio funzionale con fNIRS (ossia Functional Near Infrared Reflectance Spectroscopy). Attualmente l'IRCCS "E. Medea" sta utilizzando un dispositivo NIRS 18 canali, della Drexel University. Questa tecnica è un metodo di analisi secondario che sfrutta alcune proprietà fisiche della materia ed in particolare l'interazione di questa con le radiazioni del vicino infrarosso. Questa tecnica si avvale della specifica capacità di ogni composto chimico di assorbire, trasmettere o riflettere la radiazione luminosa. La combinazione delle proprietà assorbenti, combinate con quelle di dispersione dell'energia luminosa, determina la diffusa riflettanza della luce, che contiene informazioni sulla composizione chimica del campione.

La fNIRS (Functional Near Infrared Spectroscopy), più in particolare, consente di misurare a livello regionale e in modo non invasivo le variazioni nella concentrazione di emoglobina deossigenata (deoxy-Hb) e di emoglobina ossigenata (oxy-Hb), che caratterizzano l'attività cerebrale del soggetto. I pazienti saranno stimolati adattando il protocollo utilizzato con la fRMN durante la registrazione con la fNIRS.

Database: il database rappresenta il più importante strumento di scambio di informazioni tra le varie unità.

Sarà implementato in base al protocollo stabilito fra le varie unità, e conterrà tutte le informazioni che devono essere richieste e utilizzate durante tutto il progetto di ricerca.

Trasferibilità dei risultati e dei prodotti

Le valutazioni cliniche delle funzioni cerebrali residue in pazienti che hanno subito un danno cerebrale severo sono difficili anche per chi si cimenta in questo campo da anni perché la compromissione motoria può portare a risposte limitate, inconsistenti o esauribili nel tempo. La misura dell'attivazione cerebrale in risposta a stimoli sensoriali attraverso lo studio di esami funzionali cerebrali e la valutazione elettrofisiologia dell'attività elettrica cerebrale possono fornire informazioni sulla presenza, il grado e la localizzazione di residue attività cerebrali. Bisogna però ricordare come tali studi e tali tecniche utilizzate in pazienti con un danno severo dell'encefalo sono complesse dal punto di vista metodologico e richiedono attente analisi e interpretazioni. Per tale ragione le tecnologie e questi esami sofisticati non possono essere sostitutivi della valutazione clinica, ma sicuramente aiutano ad accrescere le nostre conoscenze sull'attivazione delle reti neurali nei pazienti con danno cerebrale severo. Questo è perciò di rilevanza fondamentale nelle attività cliniche che si svolgono con questi pazienti anche per la rilevanza etica che questi problemi assumono sempre più nel nostro tempo.

In questo progetto di ricerca lo studio avviene in pazienti di età infantile e questo a nostro avviso appare ancor più interessante perché l'encefalo del bambino non ha ancora raggiunto la piena maturazione delle funzioni cerebrali e questo determina meccanismi differenti di recupero o non recupero rispetto all'adulto che devono essere indagati a parte.

Queste conoscenze potrebbero aprire nuove conoscenze sui processi di recupero funzionale e sugli effetti della riabilitazione anche nei pazienti che fortunatamente, dopo un periodo di non responsività, recuperano le loro abilità motorie, cognitive e di comunicazione per indirizzare i clinici su attività che maggiormente influiscono sul recupero dei network cerebrali.

Output del progetto

Il database rappresenta il principale output del progetto. Conterrà infatti tutte le informazioni anamnestiche, cliniche che possono avere un ruolo significativo nella prognosi delle Gravi Cerebrolesioni Acquisite, le variazioni delle scale funzionali, la caratterizzazione clinica, il risultato degli esami strumentali.

Un report sarà formulato ogni 6 mesi riguardo la progressione del lavoro per informare tutte le Unità riguardo i risultati che possono essere utili alle altre unità.

Al termine del progetto i risultati clinici e strumentali del progetto saranno pubblicati e saranno portati a conoscenza della comunità scientifica.

DEVELOPMENT OF MOTOR NEURON DISEASE MODELS IN DROSOPHILA

DR.SSA GENNY ORSO

E-MAIL: GENNY.ORSO@UNIUD.IT

Linea di ricerca n. 4
Neurobiologia

Periodo di svolgimento
01.07.2009 – 30.06.2012

Tipo di ricerca
Bando Giovani Ricercatori 2007

Polo Scientifico
Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

IRCCS Eugenio Medea di Bosisio Parini, Laboratorio di biologia molecolare
Trinity College, Dublino

DESCRIZIONE RIASSUNTIVA DEL PROGETTO

Le malattie del motoneurone (MNDs) sono un gruppo eterogeneo di patologie genetiche caratterizzate dalla morte selettiva dei motoneuroni, come la Sclerosi Laterale Amiotrofica (ALS), le Paraplegie spastiche ereditarie (HSP), l'atrofia muscolare spinale e le neuropatie motorie. Negli ultimi anni sono stati identificati numerosi geni implicati in questo vasto gruppo di neuropatie assonali, sebbene la maggior parte di questi abbiano ancora una funzione sconosciuta. Le cause che possono portare a degenerazione assonale legata a mutazioni genetiche delle MND possono essere molteplici: difetti del citoscheletro neuronale dovuti a mutazioni che interessano geni implicati nelle HSP come la spastina o a mutazioni che interessano le ALS come VAPB; difetti dovuti ai motori molecolari per il trasporto assonale legati al gene che codifica per KIF5A; la distruzione del traffico endosomiale dovuta per esempio a mutazioni nel gene che codifica per alsina; e infine tossicità mitocondriale causata da geni quali spg7 (HSP) e mitofusina2 la cui mutazione causa varie forme di charcot-Marie-tooth. Lo scenario sembra alquanto complicato sia dal punto di vista genetico, per il numero crescente di geni implicati, sia dal punto di vista dei meccanismi molecolari coinvolti e infine per l'eterogeneità clinica associata a queste patologie. Infatti MND clinicamente differenti possono condividere comuni meccanismi molecolari e, viceversa, MND clinicamente simili possono essere causati da meccanismi molecolari divergenti.

Nuove conoscenze che si vogliono acquisire

Questo progetto ha l'obiettivo di definire la funzione biologica di alcuni geni

coinvolti nelle malattie del motoneurone, di capire il meccanismo patofisiologico di queste disfunzioni, e di far luce sui meccanismi di mantenimento del motoneurone il cui danneggiamento induce degenerazione assonale. Saranno utilizzate e integrate le competenze acquisite nel campo della biologia molecolare, della genetica, della biochimica, dell'imaging in vivo con l'uso di *Drosophila melanogaster* per generare modelli in vivo per MNDs associati a mutazioni di geni quali *Spg3a*, *Mitofusin2*, *Alsina*, *Spg33*. L'analisi della funzione di questi geni in un sistema in vivo consentirà di definirne il ruolo biologico e capire come alterazioni patologiche causano degenerazione assonale approfondendo la conoscenza dei meccanismi di funzionamento del motoneurone. Il modello animale *Drosophila*, versatile e facilmente manipolabile geneticamente, permetterà di generare animali transgenici per l'espressione di mutazioni patologiche e analizzarne i fenotipi al fine di definire i meccanismi patologici legati a disfunzione di geni MND.

Consentirà inoltre l'identificazione di nuovi geni che interagiscono funzionalmente con geni MND grazie alla possibilità di eseguire screens genetici in vivo. L'identificazione di tali geni interattori aiuterà sia a completare le informazioni funzionali sui diversi gruppi di MND sia a comprendere le cause della degenerazione assonale.

Trasferibilità e rilevanza per il Servizio Sanitario Nazionale

Non esiste al momento alcuna cura per i pazienti affetti dalle malattie del motoneurone, un vasto gruppo di disordini genetici che abbraccia diverse tipologie cliniche quali Paraplegia Spastica Ereditaria, Sclerosi amiotrofica e atrofie muscolari spinali.

La mancanza di terapie efficaci dipende da molti fattori, come la limitata conoscenza della funzione biologica di questi geni, dei meccanismi fisiopatologici e l'assenza di sistemi modello che permettano di eseguire screens genetici e farmacologici. Per tale motivo lo sviluppo di modelli in vivo di geni implicati in MNDs è di fondamentale importanza per la comprensione della normale funzione e del meccanismo patofisiologico legato alla loro mutazione. Questo approccio sarà utile non solo per capire quale siano le cause specifiche di diversi sottogruppi di MND, ma anche per svelare meccanismi patofisiologici condivisi dai disordini del motoneurone che possano contribuire a identificare terapie comuni.

NEUROFUNCTIONAL ALTERATIONS OF BODY REPRESENTATION IN ANOREXIA NERVOSA: NEUROPSYCHOLOGICAL MEASURES AND NEUROPHYSIOLOGIC TREATMENTS

DR. COSIMO URGESI

E-MAIL: COSIMO.URGESI@UNIUD.IT

Linea di ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Periodo di svolgimento

36 mesi

Tipo di ricerca

Bando Giovani Ricercatori 2008

Polo Scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato

Collaborazioni

U.O. NR2 IRCCS E. Medea di Bosisio Parini, Centro Studi di Neuroimaging dell'Età Evolutiva IRCCS Eugenio Medea di Bosisio Parini, Dipartimento di Scienze Cognitive dell'Università di Trento, Dipartimento di Psicologia dell'Università La Sapienza di Roma

RIASSUNTO E COLLABORAZIONI

The present project aims at providing a neuropsychological and neurophysiologic description of body representation disorders in Anorexia Nervosa (AN). Furthermore, it aims to investigate the possibility to modulate by means of rTMS the neural activity of the brain areas involved in body perception and identify an rTMS protocol for therapy of AN disorders.

The project will involve two centers of the IRCCS Medea: the rehabilitation center in San Vito al Tagliamento (PN), coordinated by Prof. Franco Fabbro, and the Service for Eating Disorders in Bosisio Parini (LC), coordinated by Dr. Gian Luigi Mansi. The multicentre data collection will allow to recruit an appropriate number of patients and to establish harmonized procedures for data collection and analysis.

The principal investigator will start collaborations with other researchers that will allow complementing his expertise:

1) Prof. Francesco Pavani, Associate Professor of Experimental Psychology at the Department of Cognitive Science and Education of the University of Trento, and Dr. Massimiliano Zampini, holding a Professorship "Rientro dei Cervelli" at the Department of Cognitive Science and Education, University of Trento. This group is expert in the neuropsychological investigation of multi-sensory integration and will collaborate in the study of the multisensory construction of body representation in

AN patients, the development of new non-subjective methods for assessing body-size overestimations, and the study of the attentional modulation of body image distortions.

2) Prof. Salvatore M. Aglioti, Full Professor of Psychobiology and Physiological Psychology at the Department of Psychology of the University of Rome "La Sapienza". Prof. Aglioti is expert in the neuropsychological, neurophysiologic and neuroimaging investigation of body representation and will provide support for the study of the neurophysiologic modulation of body aesthetic perception in AN patients.

Descrizione del progetto

Anorexia Nervosa (AN) is a severe and disabling disease, characterized by the altered perception of personal body shape and the fear to put on weight or get fat. Its typical onset is in adolescence and early adulthood. The incidence of AN is 4-8 cases per 100000 person years and it affects women more often than men, with high social, personal and family impact and suffering. AN is the psychiatric disorder with the highest mortality rate (estimated at 10% within 10 years of diagnosis) and the leading cause of death in young females within the 15-24 age range. Evidence based data regarding the efficacy of currently available treatments are still limited. International guidelines sustain the need for a multidisciplinary approach involving psychiatric, psychological and nutritional competences (<http://www.nice.org.uk>).

Until now, models and treatments for AN stemmed from approaches based on psychodynamic or on motivation, personality and social factors. However, recent advances in the cognitive neuroscience of body representation could offer new insights into the etiopathogenesis of the disorder and have the potential to provide more efficacious treatments.

Body representation distortions and body dissatisfactions are a defining feature of AN according to the DSM-IV. Furthermore, persistent body image distortions and dissatisfactions are also a negative predictor of recovery. In the present project, we will combine new knowledge and paradigms from cognitive neuroscience of body perception with a two-fold aim: 1) to provide a thorough characterisation of the pathological perceptual distortions in AN; 2) to assess possible intervention methods informed by current advances in cognitive neuroscience of body perception.

The human body is a very special 'object' that is optimally represented in the brain thanks to the balanced integration of the sensory signals originating from multiple sensory modalities.⁴ Recent studies have shown the effects of this multisensory integration for body representation, adopting simple behavioural paradigms that also proved useful to detect any body mispercep-

tion. For instance, people can fail to correctly localize either their own entire body or just their own body-parts, when presented with conflicting sensory inputs^{5,6} (i.e., incongruent visual, tactile and proprioceptive information), revealing that exposure to simple multisensory discrepancies can highlight the relative contribution of different sensory modalities in the construction of the body representation. Similarly, people can distort tactile distances on the skin based on previous visual or proprioceptive experience they acquired about the stimulated body part⁷, revealing that estimation of tactile distances can indirectly inform about the perceived body size. We will extend these behavioural approaches to AN patients, to examine to what extent body distortion in this clinical population may reflect a failure to integrate sensory inputs in an optimal fashion. This is an entirely novel approach, with relevant clinical implications for existing methods of diagnosis and treatment (e.g., comparison between seen and felt body perception in AN patients).

Recent neuroimaging and neurophysiologic studies have demonstrated the existence of a lateral occipito-temporal area, the extrastriate body area (EBA), that is specifically involved in the processing of body morphology⁸⁻¹¹. We will test the possibility to modulate EBA activity by using repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). This will allow to conduct a sham controlled study of the effects of rTMS for therapy of AN disorders. Although interest in the use of rTMS for therapy of psychiatric disorders has become popular¹², no study has so far investigated the possibility to use rTMS to ameliorate the body image disorders in AN patients. A very recent study failed to show additional benefit over placebo of rTMS of left dorsolateral prefrontal cortex for the reduction of purges in patients with Bulimia Nervosa¹³. The present project, however, aims at using an innovative approach to test the therapeutic effects of rTMS in psychiatric disorders. Indeed, most of the previous studies have localized the stimulation site anatomically, without the structural or functional MRI scanning of the patients. In the present project, the stimulation site will be identified functionally. Furthermore, in previous studies, the therapeutic effect of stimulation was evaluated only as changes of the gravity of the symptoms on standard psychiatric scales. In the present project, we will identify an experimental task that highlights the pathologic behaviour of AN patients and that taps the functional role of the stimulated area. With this approach we will be able to have a direct measure of the effect of rTMS and implement a clinic protocol for the therapeutic approach to AN or to some of its symptoms.

To characterize the body perception disorders in AN two activities will be planned and conducted in an integrated way.

Activity 1: Neuropsychological Evaluation of Body Representation Disorders in AN.

The neuropsychological features of body representation disorders in AN will be investigated in a series of 4 study. Each study will compare 15 AN patients and 15 age-matched healthy controls. They will be between 15-25 year-old and a BMI >15.

1) We will characterise the multisensory construction of body representation in AN patients, through paradigms derived from the domain of experimental psychology (e.g., responses to multisensory conflicts) and neuropsychological testing of perceptual and attentive functions across different senses. The main paradigm will rely on the exposure to conflicting visual and proprioceptive body inputs.⁵⁻⁶ Using virtual reality systems, participants will be presented with a video image of their own body (or body parts), misplaced or transformed in size with respect to the felt body position or size. We will compare AN patients and controls to investigate how conflicting multisensory body inputs are integrated in the two different groups. As a controls condition, participants will also be tested for multisensory integration abilities that do not involve bodily sensations.

2) We will develop new non-subjective methods for assessing the body distortions. Until now, body-size overestimations have been documented with explicit measures which could reflect beliefs or attitudes towards the body, rather than truly perceptual distortions. We will adopt a tactile distance estimation task, which proved to be modulated by perceived body size in healthy controls⁷, under the assumption that any body overestimation in AN patients should emerge as larger tactile distance perception with respect to healthy controls. This novel indirect test of body distortion will be correlated with more classical measures of body dissatisfaction in AN patients (e.g., EDI-2, Body Shape Questionnaire, Body Attitude Test).

3) We will address to what extent specific body parts (e.g., thigh or stomach) are into the focus of attention of AN patients. To the best of our knowledge, the dominant assumption that AN patients show an attentional bias for the body part target of their disturbance (e.g., thigh or stomach) has not yet been tested using attentional paradigms from experimental psychology. We will adopt simple manipulation of voluntary and automatic attention purporting to investigate any systematic allocation of attention to single body parts and its potential interaction with body misperceptions.

4) We will characterise the cognitive features of altered aesthetic perception in AN, and investigate the build up of aesthetic body preference in this population. The repeated exposure to thin or fat bodies induces a bias toward the aesthetic perception of successively presented bodies¹⁴. This priming effect may explain the influence of extremely thin body ideals on aesthetic body perception in AN. We will investigate how the perceptual appearance of the prime body image and the manipulation of the observer's attention may

modulate aesthetic priming effects in AN patients.

Activity 2: Neurophysiologic Modulation of Aesthetic Perception of Bodies in AN Patients.

We will attempt to downregulate neural activity in EBA using rTMS and modulate aesthetic priming effects in a group of 15 healthy individuals. We will use the "theta-burst" stimulation (TBS) protocol, consisting in a burst of 3 stimuli at 50 Hz, repeated at intervals of 200 ms at an intensity of 80% of the resting motor threshold.

In a successive sham-controlled study, we will test the efficacy of a rTMS protocol to modulate body aesthetic perception in AN patients. The TMS protocol that will give the most ameliorating effect on body perception disorder in the first study will be tested with AN patients in a clinical trial of active real (N = 10) or sham (N = 10) rTMS treatment. The treatment will last 3 months and the stimulation will be repeated 2 times per week; each stimulation session will last 1 hour.

Recruitment centers

The project will involve two centers of the IRCCS Eugenio Medea: the rehabilitation centers in San Vito al Tagliamento (PN), coordinated by Prof. Franco Fabbro with the collaboration of Dr. Paolo Brambilla, and the Service for Eating Disorders in Bosisio Parini (LC), coordinated by Dr. Gian Luigi Mansi, psychiatrist, with the collaboration of Dr. Alessandra Fumagalli, psychologist. The multicentre data collection will allow to recruit an appropriate number of patients and to establish harmonized procedures for data collection and analysis.

Available equipment

The research centres owns different neuropsychological and psychiatric evaluation tools to provide a full neuropsychiatric and neuropsychological evaluation of patients. In particular, the following test will be administered: SCID I and II, EDI-2, Body Shape Questionnaire, Body Attitude Test, Hollingshead Scale of Social Status, GAF, SCL-90, HDRS, Barrat Impulsivity Scale, Temperament Cloninger Inventory, Perceptual Aberration Scale, Paykel checklist for life adverse events, Soloff abuse scale, Infancy Trauma Interview, the WISC for IQ evaluation and the NEPSY-II battery for the evaluation of neuropsychological functions. The resulting measures will be correlated with the implicit measures of body representation disorders and will allow to follow-up monitor the rTMS treatments.

The centres also have access to 2 MRI 3T scanners (Philips Achieva), one

in Bosisio Parini, and the other in Udine. The access to the MRI scanner will allow to functionally localize EBA for all patients and controls participating in the rTMS study.

The centre of Udine also hosts a 30 msq rTMS Laboratory equipped with a Magstim Rapid (Magstim, UK), a standard device for 1-30 Hz rTMS, a Viking IV Electromyography recording system (Nicolet Biomedical, USA), and a Softaxic Evolution Neuronavigation System (EMS, Bologna) for the scalp-MRI co-registration and for the localization of stimulation sites. The acquisition of a device for rTMS at very high frequency (up to 100 Hz) will allow to implement the TBS paradigm.

Two virtual reality set-ups will be acquired to present conflicting visual inputs concerning the body to the participants. Each set-up will comprise 1 head-mounted displays (e.g., i-glasses Video 3D Pro), 1 video-camera and a virtual 3D converter (e.g., Virtual FX I-O Display Systems) to convert the standard 2D video image into a true, holographic-like 3D projection.

Collaborations

The principal investigator will start collaborations with two groups of researchers that will allow forming a network for the multidisciplinary study of eating disorder at the IRCCS Medea.

1) Prof. Francesco Pavani, Associate Professor of Experimental Psychology, and Dr. Massimiliano Zampini, holding a Professorship "Rientro dei Cervelli", of the Department of Cognitive Science and Education, University of Trento. This group is expert in the neuropsychological investigation of multisensory integration and will collaborate in the study of the multisensory construction of body representation in AN patients, the development of new non-subjective methods for assessing body-size overestimations, and the study of the attentional modulation of body image distortions.

2) Prof. Salvatore M. Aglioti, Full Professor of Psychobiology and Physiological Psychology at the Department of Psychology of the University of Rome "La Sapienza". Prof. Aglioti is expert in the neuropsychological, neurophysiologic and neuroimaging investigation of body representation and will provide support for the study of the neurophysiologic modulation of body aesthetic perception in AN patients.

The present project will provide novel information: i) about behavioural and neurophysiological alterations of body image in AN; ii) the possible modulation effect of rTMS on the activity of dysfunctional body-related areas. This will allow a major advance in the understanding of the etiopathogenesis of AN and in the study of more efficacious treatments that may allow to rapidly

reverse the fate of this otherwise severe and disabling pathology.

The results of the experiments comprised in Activity 1 will make available for clinicians a series of neuropsychological measures for the accurate and sensitive evaluation of body representation disorders in AN patients. We will provide validation data that will show not only the existence of body perception deficits but also the levels of body representation that are altered in AN. The tests will allow to identify not only gross deficits, but also subtle deficiencies of body perception that may affect the course of the pathology. The data on body perception abilities in AN patients will be accompanied by an accurate psychopathological description of the symptoms, that may allow to identify sub-types of AN, each characterized by different body representation disorders.

As body image disorders are the most compelling clinical symptom in AN patients, an accurate psychological and neurophysiological description of these alteration will help in the diagnosis and intervention of AN. The availability of implicit neuropsychological measures will provide tools to monitor the rehabilitative follow up avoiding the limitations of the use of only clinical neuropsychiatric scales of body perception and dissatisfaction, which make it difficult to discriminate between real and placebo effects. Furthermore, the characterization of the psychological features of altered body aesthetic perception in AN will suggest new cognitive approaches to reduce the impact of the exposure to body aesthetic models in at-risk people.

The possibility to modulate by means of rTMS the neural activity of the brain areas involved in body perception will allow us to investigate the use of rTMS for therapy of AN disorders. First the effect of EBA rTMS will be tested in healthy individuals by measuring both the behavioral changes and the neurophysiologic changes induced by rTMS. Second, we will conduct a clinical trial on AN patients to test the effect of the rTMS protocol on the body perception deficits as well as on the psychopathological scales, in particular the EDI-2, Body Shape Questionnaire, Body Attitude Test, and on the weight gained at the end of the treatment. Thus, we will approach the issue of an rTMS intervention of patients with a background of knowledge on the specific neuropsychological alterations presented by patients and on the neurophysiologic and behavioral effect of the rTMS in healthy individuals. Thus, rTMS intervention will aim at modifying specific neuropsychological alterations of AN patients. We will provide a clinical rTMS protocol the effects of which will be tested both at the psychopathological, neuropsychological, and neurophysiologic level. This will greatly help the clinicians in the evaluation of the suitability of the rTMS treatment approach to the potential candidate patients.

A parallel output of the present project will be the organization at the IRCCS E. Medea of a fully equipped laboratory for the study of the neural bases of

psychiatric diseases by integrating fMRI and rTMS techniques and psychiatric, neuropsychological, and neurophysiological expertises. This laboratory, that will be named Cognitive and Affective Neuroscience Lab (CAN-Lab) will allow us to conduct multidisciplinary research on the neurofunctional alterations associated with psychiatric diseases and on their treatment with a neurophysiologic and neuropsychological approach. The Laboratory will also provide the site for the dissemination of knowledge on the neurobiological alterations associated with mental disorders to clinicians and lay people. In conclusion, our system neuroscience approach will allow to bridge the gap between the psychopathological approach to AN disorder and the growing evidence on the psychobiological alterations in AN patients.